

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.W. Seyberth
Jetzt: Prof. Dr. R.F. Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
AG Molekulare und Experimentelle Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. R.M. Nüsing
(jetzt: Klinische Pharmakologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt)
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Untersuchungen zur Cyclooxygenase-abhängigen Nephrogenese bei der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Andreas Herud
aus Offenbach am Main

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 26.02.09.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R.M. Nüsing

Korreferent: PD Dr. U. Kuhlmann

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1.	Die physiologische Nierenentwicklung	1
I.2.	Einfluss von NSAIDs auf die Nephrogenese	8
I.3.	Die Cyclooxygenase	9
I.4.	Das COX-2 ^{-/-} -Mausmodell	13
I.5.	Prostaglandin-Rezeptoren	16
I.6.	Ziel der Arbeit	19
II.	Material und Methoden	20
II.1.	Material	20
II.1.1.	Chemikalien	20
II.1.2.	Medikamente	20
II.1.3.	Enzyme und Primer	21
II.1.4.	Instrumente und Apparaturen	21
II.1.5.	Sonstige Materialien	22
II.1.6.	Software	22
II.1.7.	Tiere	22
II.2.	Methoden	23
II.2.1.	Spritzschema	23
II.2.2.	Zusammensetzung der Medikamente	23
II.2.2.1.	ONO AE1-329 (EP-4-Agonist)	23
II.2.2.2.	ONO AE1-259-01 (EP-2-Agonist)	23
II.2.2.3.	ONO AE1-329 (EP-4-Agonist) <i>plus</i> ONO AE1-259-01 (EP-4-Agonist)	24
II.2.2.4.	NOC-12 (NO-Donator)	24
II.2.2.5.	Spermine NONOate (NO-Donator)	24
II.2.2.6.	Troglitazone (PPAR γ -Agonist)	25

II.2.2.7.	ONO AE3-208 (EP-4-Antagonist)	25
II.2.2.8.	SC-236 (COX-2-Inhibitor)	26
II.2.2.9.	Parecoxib (COX-2-Inhibitor)	26
II.2.2.10.	GW 501516 (PPAR α -Agonist)	26
II.2.2.11.	Rofecoxib (COX-2-Inhibitor) (Tränke)	26
II.2.2.12.	SC-236 (COX-2-Inhibitor) (Tränke)	26
II.2.2.13.	Spermine NONOate (NO-Donator) (Tränke) ...	26
II.2.3.	Verabreichen der Medikamente	27
II.2.3.1.	Spritzen der Mäuse	27
II.2.3.2.	Versuche über die Tränke	27
II.2.4.	Genotypisierung	28
II.2.4.1.	Isolation der DNA	28
II.2.4.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
II.2.4.3.	Gelzubereitung	30
II.2.4.4.	Gelelektrophorese	30
II.2.5.	Präparation der Mäuse	32
II.2.6.	Fixieren der Organe	32
II.2.7.	Parafineinbetten der Organe	33
II.2.8.	Schneiden der Organe	34
II.2.9.	Färben der Organe	34
II.2.10.	Mikroskopieren der Organe	36
II.2.11.	Statistische Auswertung	36
III.	Ergebnisse	37
III.1.	COX-2 ^{-/-}	37
III.1.1.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	39
III.2.	COX-2-Inhibitoren	40
III.2.1.	Applikation von SC-236 über die Tränke	40

III.2.1.1.	Applikation von SC-236 intraperitoneal	43
III.2.1.2.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	45
III.2.2.	Applikation von Parecoxib	45
III.2.3.	Applikation von Rofecoxib	47
III.2.4.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	49
III.2.5.	Vergleichende Zusammenstellung	49
III.3.	PGE ₂ -Rezeptoren	51
III.3.1.	Applikation eines EP-2-Rezeptor-Agonisten	51
III.3.1.1.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	54
III.3.2.	Applikation eines EP-4-Rezeptor-Agonisten	55
III.3.2.1.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	58
III.3.3.	Applikation von EP-2- <i>plus</i> EP-4-Rezeptor-Agonisten	59
III.3.3.1.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	61
III.3.4.	Applikation eines EP-4-Rezeptor-Antagonisten	61
III.3.4.1.	Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	63
III.3.5.	Vergleichende Zusammenstellung	63
III.4.	NO – Substanzen	65
III.4.1.	Applikation von Spermine NONOate (NOC-22)	65
III.4.1.1.	Applikation von NOC-22 ab Tag E6	68
III.4.1.2.	Zusammenfassung der histomorphologischen	

Daten	70
III.4.2. Applikation von NOC-12	70
III.4.2.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	72
III.4.3. Vergleichende Zusammenstellung	72
III.5. PPAR-Agonisten	74
III.5.1. Applikation des PPAR γ -Agonisten Troglitazone	74
III.5.2. Applikation des PPAR δ -Agonisten GW501516	75
III.5.3. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten	77
III.5.4. Vergleichende Zusammenstellung	77
IV. Diskussion	79
IV.1. Einfluss von COX-2-Inhibitoren auf die Nephrogenese	80
IV.2. Einfluss von EP-Agonisten auf die Nephrogenese	82
IV.3. Einfluss eines EP-4-Antagonisten auf die Nephrogenese	84
IV.4. Einfluss von NO-Substanzen auf die Nephrogenese	84
IV.5. Einfluss von PPAR-Agonisten auf die Nephrogenese	85
V. Zusammenfassung	88
VI. Literaturverzeichnis	90
VII. Abkürzungsverzeichnis	98
VIII. Anhang	100

VIII.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer	100
VIII.2. Danksagung	100

I. Einleitung

I.1. Die physiologische Nephrogenese

Das Genital-, und auch das Harnsystem mit Niere, entwickeln sich aus dem intermediären Mesoderm. In der 4. Woche beginnt der Embryo sich abzufalten. Dabei wird das intermediäre Mesoderm nach ventral verlagert und in der Leistenregion entsteht durch eine längliche Vorwölbung die Nierenleiste, die, zusammen mit der Genitalleiste, die Urogenitalfalte bildet. Über ein Mesenterium, sind beide Leisten mit der dorsalen Leibeswand verbunden.

Es entwickeln sich nun 3 Generationen von Nieren, die sich sowohl in ihrem lokalen und zeitlichen Auftreten als auch in ihrem Differenzierungsgrad voneinander unterscheiden. Es findet sich ein Wachstum in kraniokaudaler Richtung und ein Überschneiden in der zeitlichen Abfolge, wobei nie alle drei Generationen gleichzeitig angelegt sind. Dabei darf allerdings nicht der Eindruck entstehen, dass diese sich völlig unabhängig voneinander entwickeln. So haben beispielsweise alle drei einen einheitlichen Nierengang, der als Vornierengang entsteht, sich als Urnierengang bzw. Wolff-Gang fortsetzt, und aus dem die spätere Ureterknospe entspringt, gemeinsam.

Im Einzelnen setzen sich die unterschiedlichen Nierengenerationen aus der Vorniere (Pronephros), die der Niere einiger primitiver Fische entspricht, der Urnieren (Mesonephros), die ähnlich der Niere von Amphibien und Fischen ist, und der Nachnieren (Metanephros) zusammen (s. Abb. 1).

Vorniere (Pronephros). Diese wird beim menschlichen Embryo Anfang der 4. Woche im Zervikalbereich angelegt. Sie ist rudimentär und hat bei höheren Vertebraten keine Funktion. Es werden zwar 5 – 7 Tubuli und Glomeruli gebildet, am Ende der 4. Woche haben sich diese aber schon wieder zurückgebildet. Einzig der Vornierengang bleibt erhalten. Dieser entsteht aus dorsal gelegenen aussprossenden Mesenchymzellen des intermediären Mesoderms. Er wird epithelialisiert, bekommt ein Lumen und zieht nach kaudal. In Höhe der Urnieren erhält er Anschluss an die Urnierenkanälchen und mündet um den 26. Tag in die Kloake. Dieser Gang wird nun als Wolff-Gang bezeichnet.

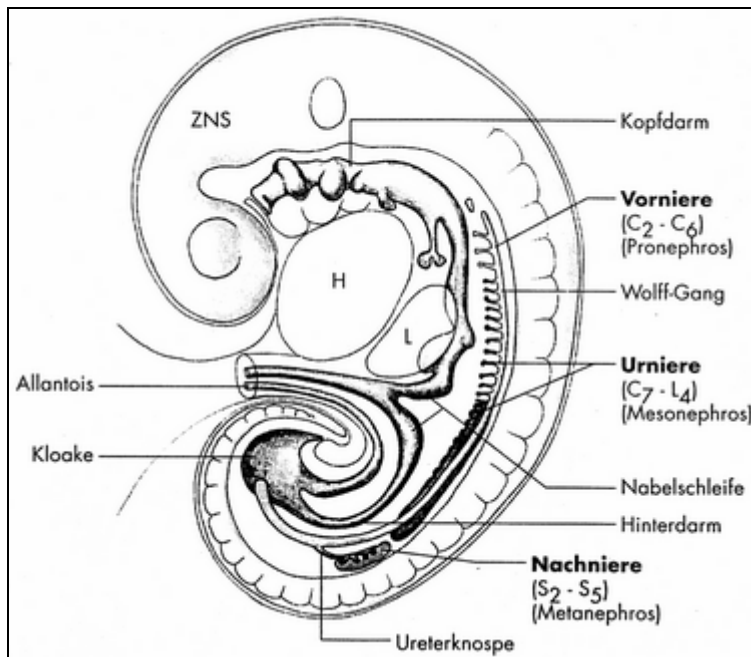


Abb. 1; Schema der drei embryonalen Nierengenerationen im Bereich der dorsalen Rumpfwand. H = Herzbeutel, L = Leberanlage, ZNS = Zentrales Nervensystem (nach Rohen, Lütjen-Drecol; Funktionelle Embryologie; Schattauer [2003])

Urniere (Mesonephros). Sie entsteht in direktem Anschluss an die Vorniere am Ende der 4. Woche im Thorakal- bzw. Lumbalbereich und wird dabei durch den Wolff-Gang induziert. Bei einigen Säugetieren erlangt die Urniere eine Funktion, beim Menschen dagegen wird eine Funktion von sehr geringem Ausmaß zwischen der 6. und 10. Woche angenommen. Durch Zellverdichtungen und Lumenbildung im mesonephrogenen Gewebe werden Urnierenbläschen gebildet, die zu S-förmigen Schläuchen, den Urnierenkanälchen, heranwachsen (s. Abb. 2a-c). Dabei wachsen sie soweit nach lateral vor, bis sie den Wolff-Gang erreichen und mit diesem verschmelzen. An ihrem medialen Ende bilden die Kanälchen bzw. Tubuli zweischichtige epitheliale Becher, die so genannte Bowman-Kapsel, in die sich Kapillarschlingen mesenchymaler Herkunft einstülpen (s. Abb. 2d-e). Die Entwicklung dieser Strukturen geschieht nacheinander von kranial nach kaudal. So kommt es dazu, dass sich lumbal gelegene Urnierenkanälchen gerade erst bilden, während thorakal gelegene bereits wieder degenerieren. Auf diese Weise gibt es nie mehr als 40 Tubuli zur gleichen Zeit. Mit Eintritt in die Fetalzeit ist meist schon die gesamte Urniere zurückgebildet. Beim Mann bildet der Wolff-Gang den ableitenden Samenweg.

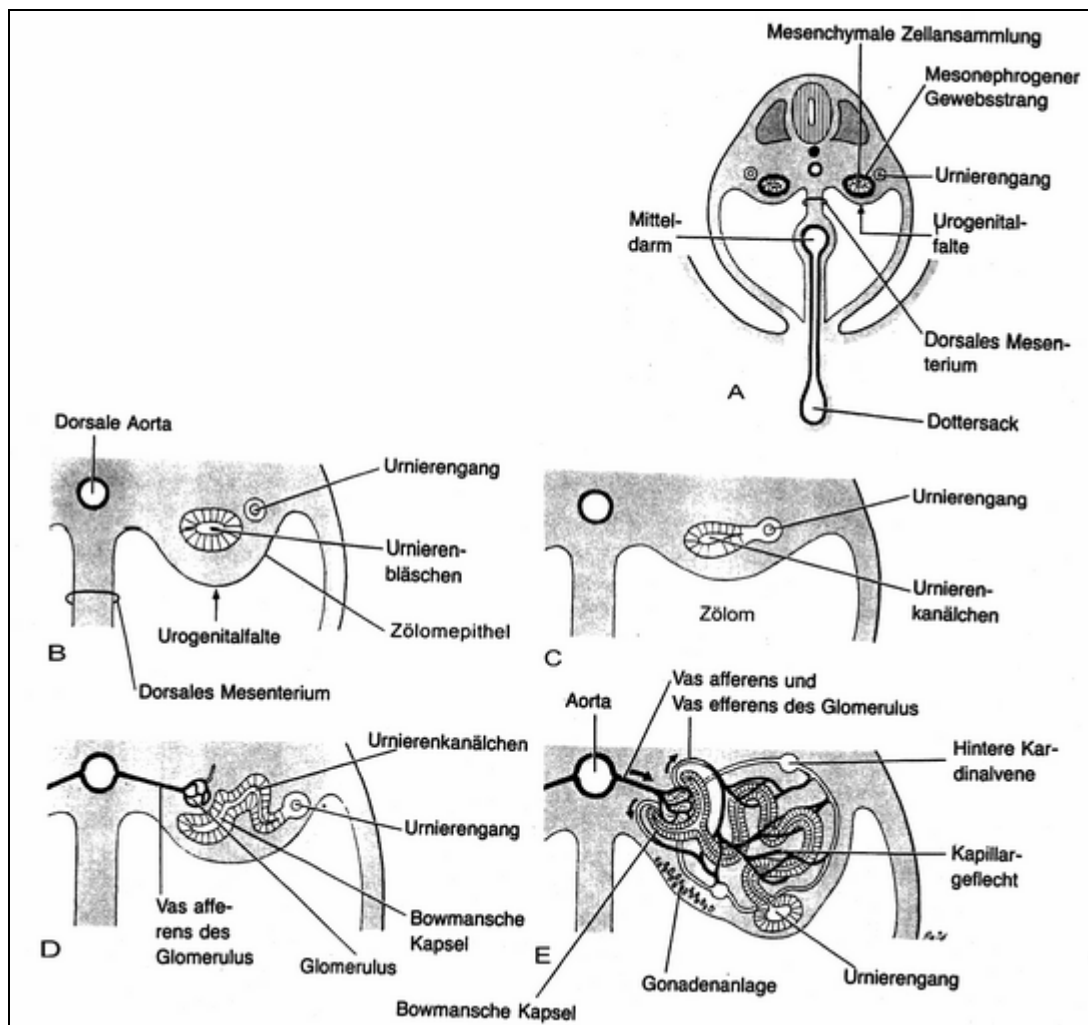


Abb. 2; A: Querschnitt durch einen 5 Wochen alten Embryo zur Darstellung des mesonephrogenen Gewebes, aus dem sich die Urnierenkanälchen entwickeln. B-E: Querschnittsschemata der verschiedenen Entwicklungsstadien der Urnierenkanälchen. (nach: Moore, Persaud; Embryologie - Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen; Schattauer [1996])

Nachniere (Metanephros). Die Nachniere beginnt sich am Anfang der 5. Woche in Höhe des ersten Sakralsegments zu entwickeln. Dazu fängt die Ureterknospe kurz vor dem Übergang in die Kloake an, aus dem Wolff-Gang nach dorsokranial in das metanephrogene Blastem auszusplassen. Dieser Vorgang induziert die umliegenden Mesenchymzellen sich zu verdichten und sich wie eine Kappe über die Knospe zu legen. Dies wiederum induziert die Ureterknospe sich kontinuierlich dichotom zu teilen. In dessen Folge entstehen Ureter, Nierenbecken, Nierenkelche und aufeinander folgende Generationen von Sammelrohren. Dabei bilden die ersten drei bis vier Ge-

nerationen dieser Rohre, durch Vergrößerung und Konfluenz, die Calices maiores, und die zweiten vier die Calices minores (s. Abb. 3).

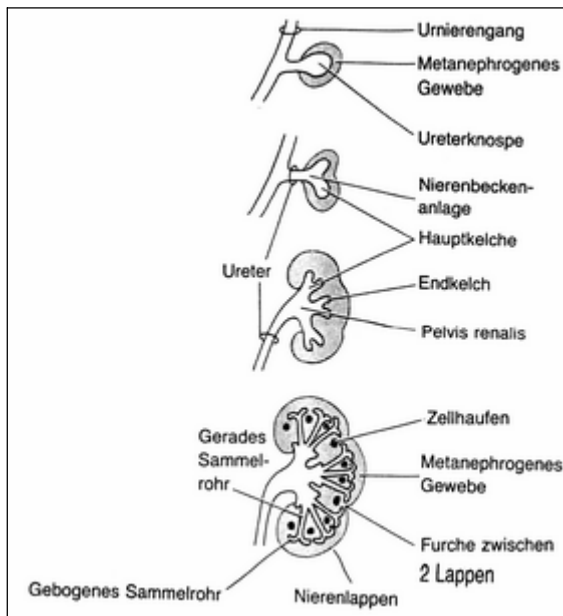


Abb. 3; Vier aufeinander folgende Stadien der Nachnierenentwicklung. (nach: Moore, Persaud; Embryologie - Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen; Schattauer [1996])

Alle weiteren Generationen bilden die definitiven Sammelrohre. Weiter induziert diese immer weiter fortschreitende dichotome Teilung am Ende der 6. Woche die mesenchymalen Zellverdichtungen, um das Ende der blind endenden Sammelrohre zu epithelialisieren und Bläschen zu bilden. Diese entwickeln sich dann zu sog. *Comma-shaped bodies* und anschließend zu *S-shaped bodies* weiter (s. Abb. 4). Dabei formt dieser, durch Eindringen von Endothel- und vermutlich von Mesangiumvorläufer-Zellen in den unteren Spalt des *S-shaped body*, das Glomerulum (s. Abb. 5). Anschließend kommt es bis zum Verschmelzen mit dem jeweiligen Sammelrohr um die 10. Woche, zu einem Längenwachstum dieses S-förmigen Tubulus, in dessen Verlauf proximaler Tubulus, Henle-Schleife und distaler Tubulus entstehen. In diesem Prozess entstehen 500.000 - 1.000.000 Nephronen in der Nierenrinde von außen nach innen, ehe die Entwicklung in der 34. bzw. 35. Woche abgeschlossen ist.

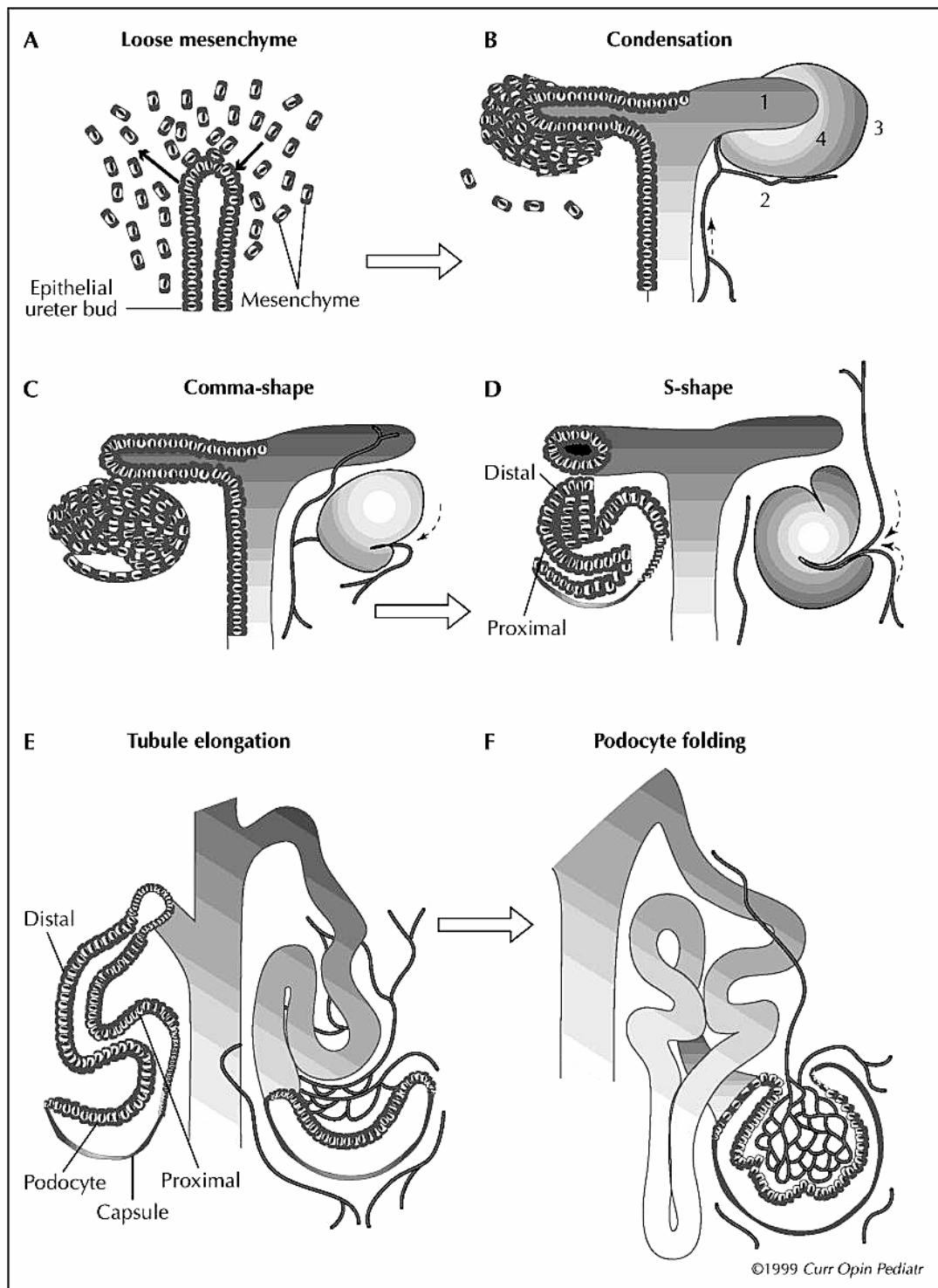


Abb. 4; Schematische Präsentation der Nephrogenese. **A:** lockeres Mesenchym **B:** Kondensation; 1: Ureterepithel 2: Blutgefäße 3: undifferenziertes Epithel 4: in Epithel differenzierendes kondensiertes Mesenchym **C:** Comma-shape Tubulus **D:** S-shape Tubulus **E:** Tubulus Längenwachstum **F:** Podozytenfalten; Epithelial ureter bud: epithelialisierte Ureterknospe; Capsule: Kapsel (nach Gomez et al.; Recent advances in renal development; Current Opinion in Pediatrics 11 [1999])

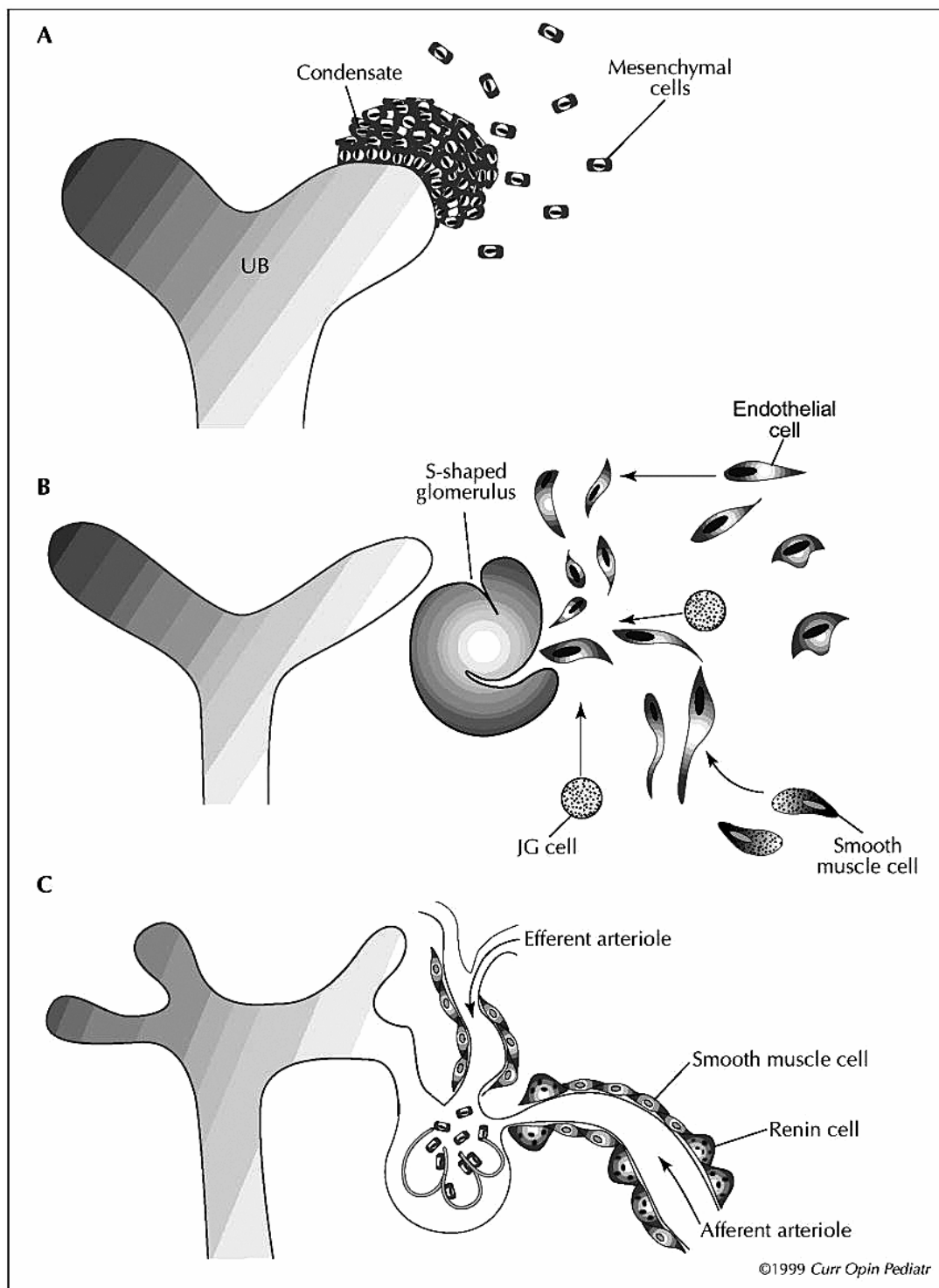


Abb. 5; Wichtige Schritte in der Vaskularisation eines Nephrons. UB: Ureterknospe; JG cell: Juxtaglomeruläre Vorläuferzelle; smooth muscle cell: Zelle glatter Muskulatur; endothelial cell: Endothelzelle; mesenchymal cell: Mesenchymzelle (nach Gomez et al.; Recent advances in renal development; Current Opinion in Pediatrics 11 [1999])

In viele der oben beschriebenen Vorgänge scheinen unterschiedliche Gene involviert zu sein. Eine Auflistung bekannter Gene, die für eine reibungslose Nierenentwicklung in den einzelnen Differenzierungsstadien von Bedeutung zu sein scheinen und was bei einem Defekt zu beobachten ist, gibt Tabelle 1 und Abb. 6.

Gen	Gewebe-expression	Defekt
<u>Proteoglykane und ihre biosynthetischen Enzyme</u>		
Hs2st	UK, MM	Fehlende Nierenanlage durch fehlende UK-Teilung und mesenchymale Kondensation
Gpc3	UK,MM	Selektive Degeneration d. medullären Sammelrohre
<u>Transkriptionsfaktoren</u>		
Emx2	UK, MM	Fehlen von Niere, UK, Genitaltrakt
Eya1	MM	Fehlendes UK-Wachstum und MM-Induktion
Foxc1	MM	Zwei Nieren und doppelte UKs
Foxd1	S	Kleine Nieren mit wenigen Nephronen
Pax2	UK, MM	Fehlerhaftes UK-Wachstum, MM wird nicht induziert
Rara, Rarb	UK, S, MM	Hypoplasie/Agenesie
Sall1	MM	Fehlerhaftes UK-Wachstum
Wt1	MM	MM begeht Apoptose
<u>Wachstumsfaktoren</u>		
Bmp4 (het)	MM	Hypo-/Dysplastische Niere, Hydroureter, Doppelsammelrohre
Bmp7	UK, MM	Schwere Hypoplasie mit wenigen Nephronen und Sammelrohren
Fgf7	S	Kleine Nieren, wenig UK-Verzweigungen und Nephronen
Gdnf	MM	Agenesie, da fehlerhaftes UK-Wachstum
Wnt4	MM	Fehlerhafte Tubulusformationen
<u>Wachstumsfaktoren/-rezeptoren</u>		
Gfra1	UK, MM	Agenesie, da fehlerhaftes UK-Wachstum
Notch2	MM	Glomeruläre Defekte
Ret	UK	Fehlerhafte UK-Wachstum

Tab. 1; MM: Metanephrogenes Mesenchym; S: Stromazellen; UK: Ureterknospe

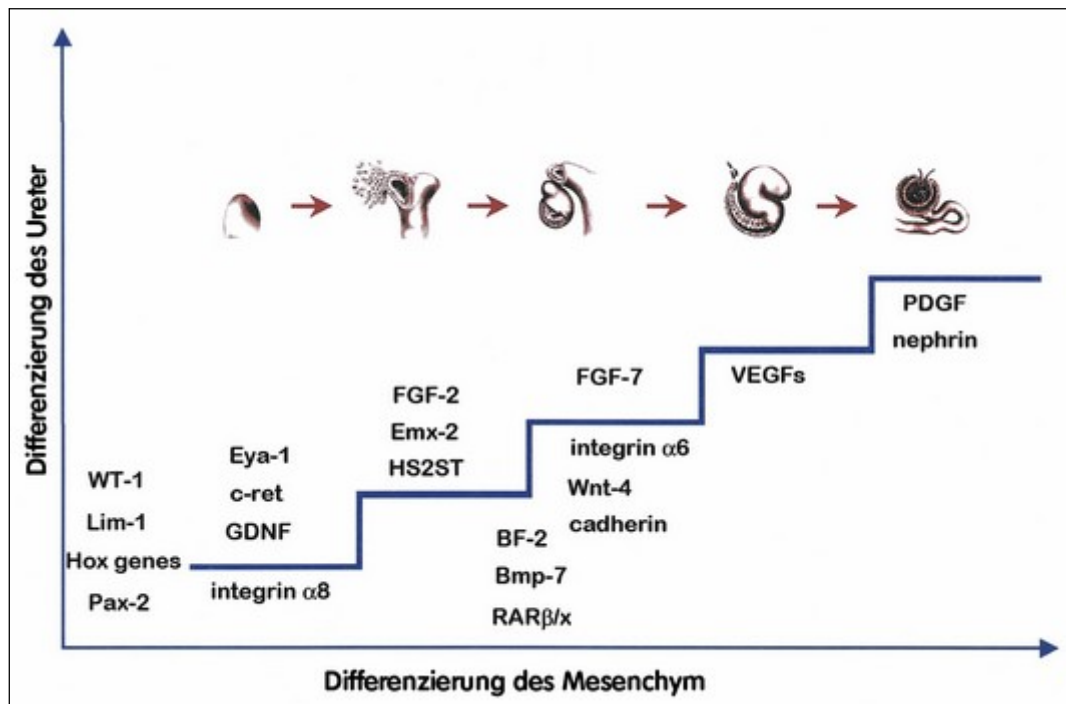


Abb. 6; Schrittweise Differenzierung des Ureters und des Mesenchym in Abhängigkeit verschiedener Gene (nach Kuure et al.; Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation; Mechanism of development 92 [2000])

I.2. Einfluss von NSAIDs auf die Nephrogenese

Im klinischen Alltag sind non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) wie Acetylsalicylsäure (ASS) und Indomethacin häufig verwandte Arzneimittel. Dabei reicht die Indikation von einfachem Kopfschmerz, über Infarktprophylaxe in Herz und Gehirn, bis hin zur Tokolyse und Polyhydramnion-Therapie.

Hieraus ergibt sich auch direkt das Problem, welches erstmals von Novy [1978] am Rhesusaffenfetus nach Indomethacineinnahme gezeigt wurde. Nimmt eine Schwangere Indomethacin für mehr als 48 h aus z.B. einem der oben genannten Gründe ein, kann hieraus *in utero* ein Oligohydramnion mit postnataler Anurie und im schlimmsten Fall der perinatale Tod resultieren [van der Heijden et al., 1994]. Hervorgerufen wird dies unter anderem durch eine Nierenfehlentwicklung mit folgender tubulärer Dysfunktion und Niereninsuffizienz, bis hin zum akuten Nierenversagen [Restaino et al., 1991; Niebyl und Witter, 1986; Simeoni et al., 1989; Heuden et al., 1988]. Dabei kann neben der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auch der renale Blutfluss (RBF) reduziert sein [Kaplan et al., 1994]. Dies ist deutlich zu sehen am gestiegenen Serum-Kreatinin Wert [Norton et al., 1993]. Beim Erwachsenen deutet dies auf ein hä-

modynamisches Problem hin und ist gehäuft bei Patienten mit ohnehin geschwächter Nieren-, Herz- und Leberfunktion zu verzeichnen [Leone et al., 1999].

Bei mikroskopischer Betrachtung fällt auf, dass in der Frühphase der Nierenentwicklung die *S-shaped bodies* verformt und die sich entwickelnden Tubuli aufgerollt erscheinen. Im weiteren Verlauf stellen sich die Glomeruli als zu klein bzw. als multiple Anlage in dilatierten Bowman-Kapseln dar, denen sich atrophische Tubuli anschließen [van der Heijden et al., 1994]. Dabei sind die Glomeruli von kuboidalen oder zapfenförmigen Podozyten bedeckt [Kaplan et al., 1994]. Bei der Übersichtsbeachtung der von van der Heijden [1994] als normal groß und von Novy [1978] als zu klein beschriebenen Nieren sind zahlreiche zystische und fibrotische Veränderungen zu sehen [Kaplan et al., 1994]. Durch den reduzierten renalen Blutfluss (RBF) sieht der tiefe Kortex ischämisch aus [van der Heijden et al., 1994].

Weitere beobachtete Nebenwirkungen unter NSAID-Einnahme sind der zu frühe Verschluss des Ductus arteriosus, der Hydrops fetalis, die Ileumperforation, diverse Blutungen, eine pulmonale Hypertonie, äußerstenfalls eine Totgeburt [Kaplan et al., 1994].

I.3. Die Cyclooxygenase

NSAIDs wirken durch Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Prostaglandine sind das Produkt der Cyclooxygenase (Prostaglandinsynthase).

Ausgangspunkt der Synthese ist die Arachidonsäure. Diese ist eine essentielle, mehrfach ungesättigte Fettsäure, die entweder erst aus anderen essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren vom Körper gebildet oder mit der Nahrung zugeführt wird. Sie wird dann in Phospholipide der Plasmamembranen eingebaut, um dann bei Bedarf durch die Phospholipase A₂ wieder freigesetzt zu werden. Damit steht sie als essentielles Substrat der Synthese von Eicosanoiden zur Verfügung. Diese können auf zwei unterschiedlichen Wegen produziert werden. Zum einen über den Cyclooxygenaseweg, hier entstehen Prostacycline, Prostaglandine und Thromboxane, und zum anderen über den Lipoxygenaseweg, durch den Leukotriene produziert werden.

Die COX ist ein membrangebundenes Haem- und Glycoprotein, das sowohl Bisoxxygenase- als auch Peroxydaseaktivität besitzt. Aus Arachidonsäure synthetisiert sie

über PGG_2 das Endoperoxid PGH_2 , welches seinerseits Substrat für die Bildung der Prostaglandine (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2), des Prostacyclins (PGI_2) und des Thromboxans (TXA_2) ist [Smith, Marnett, DeWitt, 1991] (s. Abb. 7). Diese gehören zusammen mit den Leukotrienen zur Gruppe der Eicosanoide, den so genannten Gewebshormonen. Sie können von fast allen Körperzellen synthetisiert werden und ihre Funktion ist vielfältig. Diese reichen von der Tonuskontrolle glatter Muskulatur (Blutdruck, Bronchien, Uterus), über die Beeinflussung der Zellwanderung und -aggregation (Leukozyten, Thrombozyten), bis hin zu wirkungsvollen Schmerzsignalen an Nociceptoren. Dabei entfalten sie ihre Wirkung in unmittelbarer Nähe ihrer Entstehung sowohl auto- als auch parakrin. Jedoch werden sie innerhalb von Sekunden bis Minuten durch enzymatische Reduktion von Doppelbindungen und Dehydrierung von Hydroxygruppen oder spontaner Umsetzung wieder inaktiviert.

Es gibt zwei Isoformen der Cyclooxygenase, COX-1 und COX-2, die in der Maus und auch beim Menschen durch zwei unterschiedliche Gene kodiert werden, *Ptgs1* und *Ptgs2*.

Die COX-1 stellt die konstitutive Form dar und wird in den meisten Geweben der Säuger exprimiert, speziell jedoch in Magen, Thrombozyten und glatter Gefäßmuskulatur. In der Niere findet man sie im Gefäßendothel, in medullären Sammelrohren und in medullärem Interstitium [Smith und DeWitt, 1995; Crofford, 1997]. Damit ist die COX-1 für die Prostaglandinversorgung im zellulären Haushalt verantwortlich und übernimmt insbesondere Aufgaben in der Magenzytoprotektion, der vaskulären Homeostase und der normalen Nierenversorgung mit weitgehend konstanter Enzymaktivität [DeWitt et al., 1993; Smith und DeWitt, 1995] und wird daher auch als „housekeeping enzyme“ bezeichnet.

Dem gegenüber steht die COX-2, deren wesentlicher Unterschied zur COX-1 die größere Promotorregion am 5'-Ende des COX-2-Gens und das gehäufte Vorkommen der AU-Instabilitätssequenzen im nichtkodierenden 3'-Ende der mRNA ist. Die Promoterregion enthält wichtige Kontrollelemente, an die Transkriptionsfaktoren binden und damit die Transkription steuern können. Dabei kann die Induktion von zahlreichen intra- und extrazellulären Stimuli ausgehen:

Cytokine (Interleukin- 1β und -2, Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ), Wachstumsfaktoren (Transforming growth factor- α und - β , Platelet derived growth factor, Epidermal growth factor), Gewebshormone (Plättchenaktivierender Faktor, Endothelin),

Hormone (Progesteron, FSH, LH, HCG), Tumorpromotoren (Phorbolester, Forskolin), Viren und Bakterienbestandteile (Lipopolysaccharide). Im Zuge der Induktion des COX-2-Proteins nimmt auch die Prostanoidproduktion zu [Williams und DuBois, 1996]. Aufgrund dieser vielfältigen Induzierbarkeit spricht man bei der COX-2 auch von der induzierbaren COX-Form.

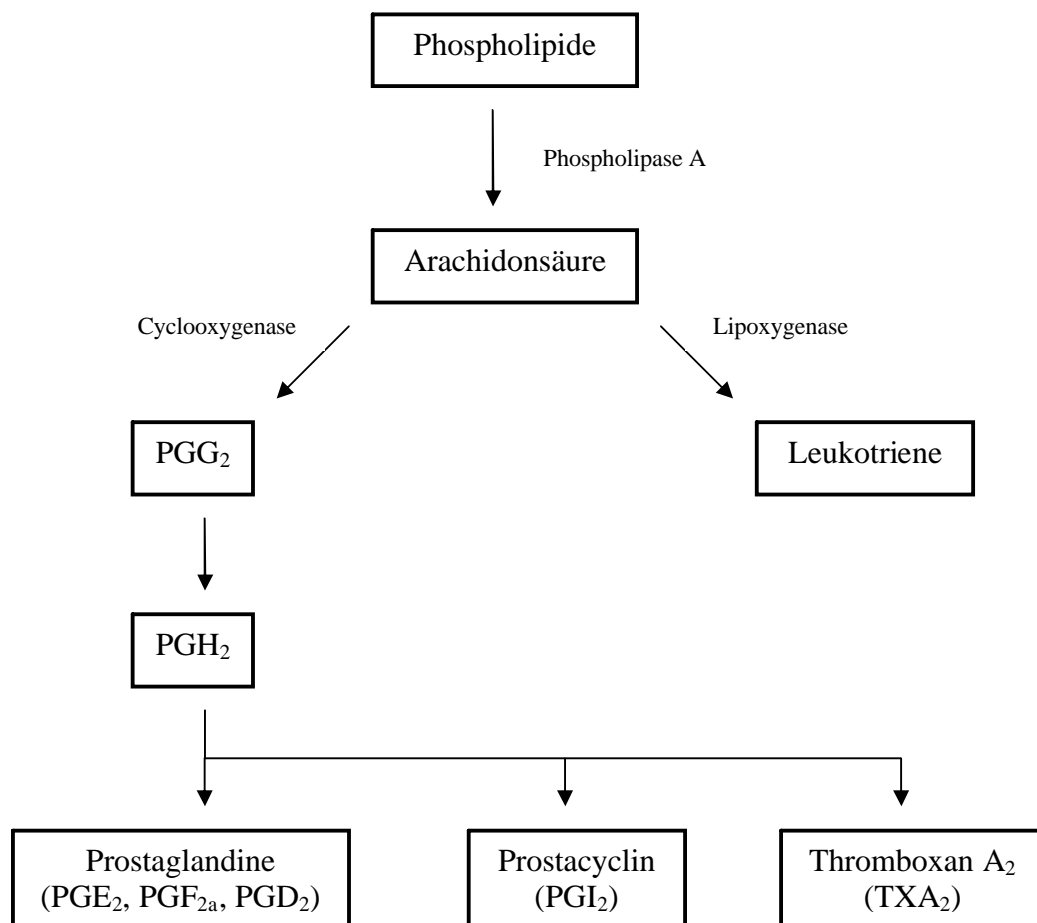


Abb. 7; Der Cyclooxygenaseweg

Gehemmt wird die Induktion durch Glukokortikoide und Interleukin-10 [Mertz et al., 1994; Kujubu und Herschmann, 1992]. NSAID dagegen senken die Prostanoidproduktion durch Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität. Das Bekannteste unter den NSAID, ASS, acetyliert eine Seringruppe an der Substratbindungsstelle und blockiert irreversibel die Substratverarbeitung [Meade et al., 1993].

Die COX-2 ist in den meisten Geweben nicht nachweisbar bzw. wird nicht konstant exprimiert [Smith und DeWitt, 1995; Kömhoff et al., 2000]. Sie kann aber, wie bereits erwähnt, durch diverse Stimuli induziert werden, sodass sie beim Erwachsenen besonders während des Zellwachstums und in der Entzündungsphase in Erscheinung tritt [O'Banion et al., 1991; Masferrer et al., 1992; Mitchel et al., 1993]. Eine Ausnahme stellt dabei die Niere dar. In dieser wird sowohl im Fetus als auch im Erwachsenen bei allen Spezies COX-2 exprimiert [Harris et al., 1994; Kömhoff et al., 1997; Zhang et al., 1997; Khan et al., 1998].

Eine COX-2-mRNA Expression in der sich entwickelnden Mäuseniere konnte in den ersten epithelialen Strukturen des metanephritischen Mesenchyms, den renalen Bläschen, entdeckt werden [Dressler, 1995]. Darüber hinaus konnte die COX-2-mRNA Expression in den *comma-* und *S-shaped bodies*, besonders bzw. vorherrschend in den sich entwickelnden Tubulusepithelien nahe der Glomeruli gezeigt werden. Eine deutliche Expression an der juxtamedullären Macula densa ist ab dem Tag E14,5 zu beobachten. In der reifen Niere bleibt sie auf Zellen dieser Region beschränkt. Postnatal ist im Immunoblot ein Anstieg der COX-2-Protein Expression vom Tag P0 bis P4, wo es einen Peak erreicht, zu verzeichnen, der aber anschließend schnell wieder sinkt [Kömhoff et al., 2000].

Im Rattenmodell konnte ebenfalls eine entwicklungsabhängige COX-2 Expression gezeigt werden [Zhang et al., 1997]. So ist dessen Ausmaß am Tag P0 vergleichbar mit der einer erwachsenen Ratte. Dies ändert sich jedoch ab Tag P1, ab dem das Signal erst stärker und dann von Tag P3 bis P7 beträchtlich ansteigt. Von Tag P7 bis P14 hält es das Level, um danach wieder abzufallen (Northern Analysis). Im Immunoblot ist bis zum Peak an P14 ebenfalls ein Anstieg zu beobachten. Eine erste diffuse cytoplasmatische COX-2-Expression zeigt sich ab Tag E16 in sich verzweigenden Sammelrohren und *S-shaped bodies*. Im weiteren Verlauf kann man im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife eine diffuse und in Zellen nahe der Macula densa eine starke COX-2-Expression feststellen. Die Macula bleibt jedoch COX-2 negativ. Dabei wandert die COX-2-Expression von juxtamedullär nach außen in den Kortex, wobei aber die COX-2-Zellzahl konstant bleibt. Dies deutet auf eine entwicklungsabhängige Hoch- und Runterregulation hin. In entwickelten Abschnitten wird die COX-2-Expression runterreguliert und umgekehrt in noch zu entwickelnden

hochreguliert. Interessant ist auch die fünffach höhere PGE₂-Bindung in den ersten fünf Lebenstagen, verglichen mit den Nieren erwachsener Tiere [Zhang et al., 1997]. In der humanen fetalen Niere sieht das Bild sehr ähnlich aus. Auch hier zeigt sich eine starke COX-2-Expression im Bereich der Macula densa und den assoziierten dicken aufsteigenden Schenkeln der Henle-Schleife, am stärksten in den Nephronen des äußeren Kortex. Es findet sich auch hier eine progressive Abnahme der COX-2-Expression von den äußeren unentwickelten zu den inneren weiterentwickelten Nephronen. Einen Zusammenhang zwischen der Intensität der COX-2-Expression und dem Gestationsalter gibt es allerdings nicht bzw. konnte nicht gezeigt werden [Khan et al., 2001].

1.4. Das COX-2^{-/-}-Mausmodell

Durch den selektiven Knockout des Cyclooxygenase-2-Gens in der Maus fallen zunächst einmal Phänomene auf, die die Vitalität dieser Tiere betreffen. Zu diesen Phänomenen findet man in der Literatur allerdings unterschiedliche Beobachtungen. So wurde zwar von einer erwarteten Anzahl an COX-2^{-/-}-Nachkommen berichtet, aber nur 60% überlebten bis zur Entwöhnung. Von diesen wiederum überlebten lediglich 75% das erste Lebensjahr [Langenbach et al., 1999]. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass die Zucht nur ungefähr 35% der erwarteten Nachkommen brachte. Hierfür wird die neonatale Mortalität als essentiell angesehen [Dinchuk et al., 1995]. Die durchschnittliche Lebenserwartung einer COX-2^{-/-}-Maus beträgt 3,5 Monate [Dinchuk et al., 1995; Norwood et al., 2000], wobei nur wenige älter als 6 Monate werden [Dinchuk et al., 1995]. Ungefähr 20% der COX-2^{-/-}-Nachkommen versterben zwischen der 7. und 23. Woche [Norwood et al., 2000]. Dabei ist eine erhöhte Sterberate um die 8. Woche zu verzeichnen [Morham et al., 1995; Norwood et al., 2000]. Bei Versuchen mit COX-2^{-/-}-Weibchen stellte sich deren Infertilität heraus. Die Fertilität der Männchen bleibt davon unbeeinflusst [Dinchuk et al., 1995; Lim et al., 1997; Davis et al., 1999], sodass, um entsprechende Nachkommen zu erzeugen, heterozygote Weibchen mit homozygoten Männchen verpaart werden.

Versuche zur Entzündungsreaktion zeigten keinen Unterschied in der Reaktion auf TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) oder AA (Arachidonsäure) zwischen

COX-2^{-/-} und Wildtyp (WT) [Morham et al., 1995]. Des Weiteren belegten diese Versuche COX-2 als Hauptproduzent von Prostaglandinen in der frühen Entzündungsphase [Langenbach et al., 1999].

In der COX-2^{-/-}-Maus sind neben Veränderungen im Herz, wie diffuse myocardiale Fibrosen, und in den Ovarien, insbesondere Gewebeabnormalitäten in der Niere zu sehen. Dabei fällt die adulte COX-2^{-/-}-Maus durch chronisches Nierenversagen auf, zu erkennen am gestiegenen Serum-Kreatinin Spiegel und der Urämie, was auf eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) schließen lässt. Natrium- und Wasserhaushalt bleiben dabei unberührt [Dinchuk et al., 1995; Norwood et al., 2000].

Sowohl bei makroskopischer als auch bei mikroskopischer Betrachtungsweise sind ab der 6. Woche zahlreiche signifikante und beständige genotypabhängige Veränderungen der Niere gegenüber dem WT zu beobachten. So fällt bei Betrachtung der zu klein geratenen Nieren mit dem bloßen Auge die blasse und granuläre Erscheinung der Kapseloberfläche auf. Unter dem Mikroskop bietet sich dem Betrachter das Bild eines multifokal subkapsulär abnormalen Parenchyms mit glomerulärer Hypoplasie des äußeren Kortex. Dabei finden sich sowohl Tubulusatrophien als auch diffuse tubulärer Dilatationen. Im inneren Kortex erscheint das einzelne Nephron hypertrophiert. Zusätzlich ist in dem teilweise dünnen Kortex häufig auch die Anzahl der Glomeruli reduziert. Periglomerulär stellen sich vielfach sklerotische Veränderungen dar [Morham et al., 1995; Norwood et al., 2000]. Es wird vermutet, dass durch die Reduktion der Glomerulizahl, die angelegten Glomeruli ihre Arbeitsleistung erhöhen und dass dadurch die beschriebene Hypertrophie und Sklerose erklärt werden kann [Brenner, 1985]. Bei Betrachtung des Interstitiums sind dort diffuse fibrotische und zystische Veränderungen zu erkennen [Morham et al., 1995; Norwood et al., 2000].

Doch all diese Veränderungen sind nicht etwa schon in utero oder direkt nach der Geburt zu beobachten. Es hat sich vielmehr gezeigt, dass die Nieren am Tag E14 völlig normal aussehen und am Tag P3 nicht vom Wildtyp (WT) zu unterscheiden sind. Selbst am Tag P7 gelingt dies nicht [Langenbach et al., 1999; Morham et al., 1995; Norwood et al., 2000]. Erst am Tag P10 sind in einigen Nieren zystische Veränderungen und zusammengedrückte, kleine, subkapsulär gelegene Glomeruli zu beobachten, jedoch nicht bei allen Nieren. Gleichzeitig lässt sich dieses gehemmte Nierenwachstum auch am Nierengewicht ablesen. Ab P10 ist nämlich auch das Verhält-

nis von Nierengewicht zu Körpergewicht im Vergleich zum WT nachhaltig gesenkt. Beim Körpergewicht gibt es allerdings keine Differenzen. Ab P14 lassen sich alle COX-2^{-/-}-Nieren vom WT abgrenzen. Im einzelnen bedeutet dies, dass nun in allen COX-2^{-/-}-Nieren progressive Dysplasien des äußeren Kortex mit zystischen subkapsulären Glomeruli unter dem Mikroskop zu sehen sind. Weiterhin zeigen sich jetzt Tubulusatrophien und zystische Formationen des Interstitiums. Hypertrophien juxtamedulärer Glomeruli wurden erst ab P28, also nach 4 Wochen, gesehen [Norwood et al., 2000]. COX-2^{+/-}-Mäuse unterscheiden sich nicht vom WT [Morham et al., 1995].

Bei pharmakologischen Untersuchungen mit dem selektiven COX-2-Inhibitor SC-236 haben sich keine quantitativen Unterschiede in der Glomerulumgröße zum COX-2^{-/-} ergeben. So zeigte sich nach Gabe des SC-236 ab Tag E0,5 sowohl ein deutlich reduziertes kortikales Volumen an Tag P21 als auch ein deutlich reduzierter glomerulärer Durchmesser von $29,35 \pm 0,42 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $47,01 \pm 0,41 \mu\text{m}$ beim Kontrolltier. An P0 gab es jedoch keinen Unterschied. Der glomeruläre Durchmesser eines COX-2^{-/-}-Tieres beträgt hier $29,35 \pm 0,68 \mu\text{m}$. In der gleichen Versuchsreihe wurden dichter stehende glomeruläre Zellen und cuboidal geformte Podozyten beobachtet. Bei Gabe des SC-236 erst ab P0 bis P21 fällt der Effekt nicht ganz so deutlich aus. So betrug der gemessene Durchmesser nunmehr $37,31 \pm 0,68 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $47,01 \pm 0,41 \mu\text{m}$ beim Kontrolltier. Jedoch gab es auch in diesem Modell keine Veränderung vor P8. Auf das erwachsene Tier hatte SC-236 keinen wesentlichen Effekt. Indiz dafür, dass der COX-2 Hemmer auch diaplazentar übertragen wird, ist zum Einen die deutliche Hochregulation des COX-2 Proteins am Tag P0, die durch SC-236 hervorgerufen wird, und sind zum Anderen die deutlich besseren Ergebnisse im Zeitraum von E0,5 bis P21, als von P0 bis P21 [Kömhoff et al., 2000]

All die bis hierher beschriebenen Phänomene ergeben das Bild einer COX-2 korrelierten Nephrogenese.

I.5. Prostaglandin-Rezeptoren

Prostaglandin-Rezeptoren sind eine Gruppe von Plasmamembranrezeptoren, deren Wirkungen über G-Proteine vermittelt werden. Jedem Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels, der über die Cyclooxygenase synthetisiert wird, ist dabei ein spezifischer Rezeptor zuzuordnen. Für den Prostaglandin E₂-Rezeptor unterscheidet man zudem vier Subtypen, EP-1 - EP-4, deren Expression von Morath et al. [1999] an verschiedenen Stellen der Niere nachgewiesen werden konnte:

- EP-1:**
- in Verbindungsstücken
 - in kortikalen und medullären Sammelrohren
 - in der Media der Arterien, *Vasa recta* und peritubulärer Kapillare
 - in Zellen der *Vas afferens* und *efferens*
 - in den Glomeruli
- EP-2:**
- in der Media der Arterien und glomerulärer Arteriolen
 - im kortikalen und medullären Interstitium
- EP-3:**
- im spät distalen Tubuluskonvolut
 - in Verbindungsstücken
 - in kortikalen und medullären Sammelrohren
 - im distalen Tubulus
 - in der Media und im Endothel der Arterien, *Vasa recta* und peritubulärer Kapillare
 - in juxtaglomerulären afferenten Arteriolen
 - in den Glomeruli
- EP-4:**
- in der Media der Arterien und *Vasa recta*
 - in den Glomeruli

Neben den endogenen Liganden, der Prostaglandine, sind auch einige exogene Liganden bekannt. Während Sulproston als PGE₂-Derivat eher unspezifisch an die einzelnen EP-Rezeptoren bindet, weisen die Substanzen aus der ONO-Gruppe eine höhere Spezifität auf. So ist ONO-8713 für den EP-1-Rezeptor, ONO-AE1-259 für den EP-2-Rezeptor, ONO-AE-248 für den EP-3-Rezeptor und ONO-AE-329 für den EP-4-Rezeptor ein spezifischer Ligand [Narumiya et al., 2001]. Durch die Bindung der einzelnen Liganden an ihre Rezeptoren, werden verschiedene intrazelluläre Trans-

duktionssysteme in Gang gesetzt (Tab. 2). Die Funktionen, die dabei von PGE_2 vermittelt werden, sind vielfältig. So haben Breyer MD und Badr KF [1996] gezeigt, dass diese Einfluss auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur der Niere und damit auf den renalen Blutfluss (RBF) haben [Pallone TL, 1994; Lemley KV et al., 1984 und Silldorf EP et al., 1995]. Als weitere PGE_2 -vermittelte Funktionen in der Niere sind bekannt: eine Beteiligung an der Regulation der GFR [Schlondorff D und Ardaillou R, 1986], der Reninfreisetzung [Henrich WL, 1981] und der Elektrolyt- und Wasserregulation [Breyer MD et al., 1996; Stokes JB, 1979; Kaji DM et al., 1996]. Die einzelnen Funktionen der verschiedenen Subtypen des EP-Rezeptors in der Niere sind im Detail noch nicht aufgeklärt.

	<u>Rezeptor</u>	<u>Subtyp</u>	<u>Transduktionssystem</u>
PGD_2	DP		cAMP ↑ Ca^{2+} ↑
PGE_2	EP	EP-1	Ca^{2+} ↑
		EP-2	cAMP ↑
		EP-3	cAMP ↓
		EP-4	cAMP ↑
$\text{PGF}_{2\alpha}$	FP		Ca^{2+} ↑
PGI_2	IP		cAMP ↑
TXA_2	TP		Ca^{2+} ↑

Tab. 2; Rezeptoren der Arachidonsäuremetaboliten

Es konnte gezeigt werden, dass Prostaglandine auch Liganden an Kernrezeptoren, speziell an $\text{PPAR}\gamma$ und $\text{PPAR}\delta$, sind [Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Mital

et al., 2002]. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) sind eine Gruppe von Zink-Finger enthaltenden Transkriptionsfaktoren, eine Unterfamilie der Kernhormonrezeptorfamilie [Keller und Wahli, 1993; Mandrup und Lane, 1997; Schoonjans et al., 1996]. Man unterscheidet drei Isoformen: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Die einzelnen Isoformen der PPARs werden an unterschiedlichen Stellen und in unterschiedlichen Geweben unseres Körpers exprimiert [Vamecq und Latruffe, 1999]. Eine gesonderte Stellung nimmt dabei die Niere ein, in der alle drei Isoformen zu finden sind [Braissant et al., 1996; Guan et al., 1997].

Bei den Liganden der einzelnen PPARs kann zwischen endogenen und exogenen Aktivatoren differenziert werden (s. Tab. 3).

Die folgenden Versuche wurden mit Hilfe der PPAR-Agonisten Troglitazone, als PPAR γ -Agonist und GW501516, als PPAR δ -Agonist durchgeführt.

<u>Rezeptor</u>	<u>endogene Liganden</u>	<u>exogene Liganden</u>
PPAR α	Leukotrien B ₄	
PPAR γ	15-d-PGJ ₂ , 15-HETE	Troglitazone
PPAR δ	PGI ₂	GW501516

Tab. 3; Endogene und exogene Liganden der PPARs

I.6. Ziel der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, dass durch selektiven Knockout des COX-2-Gens eine Störung der Nierenentwicklung hervorgerufen wird. Die zugrunde liegenden COX-2-abhängigen Mechanismen einer normal ablaufenden Nierenentwicklung sind nicht aufgeklärt. Eine Beteiligung bestimmter Prostanoiden wird vermutet. Es werden aber auch NO-Substanzen und PPAR-Liganden als Signalmediatoren diskutiert.

Ein Ziel der Arbeit wird sein zu überprüfen, ob der bei einer COX-2^{-/-}-Maus beobachtete Nierenschaden auch pharmakologisch mit Hilfe verschiedener COX-2-Hemmer bei Wildtyp-Mäusen erzeugt werden kann. Hierfür werden Wildtyp-Mäuse über drei Wochen mit SC-236, Parecoxib und Rofecoxib behandelt.

Primäres Ziel der Arbeit soll aber sein, ein *Rescue* der Nephrodysgenese infolge defekten COX-2-Gens mittels verschiedener Prostanoidrezeptorliganden, NO-Freisetzern oder PPAR-Liganden zu erreichen. Dazu werden COX-2^{-/-}-Mäuse über drei Wochen mit EP-2- und EP-4-Liganden, diversen NO-Freisetzern und PPAR-Liganden behandelt. Bei allen Versuchsreihen erfolgt am Tag P22 die Organentnahme zur histomorphologischen Untersuchung. Die Nieren werden dabei auf das Volumen ihrer Glomeruli, die Distanz dieser Glomeruli von der Nierenkapsel, den Anteil der Glomeruli innerhalb einer Kortexzone von 58 µm und das Verhältnis des Nierengewichts zum Körpergewicht hin untersucht.

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Chemikalien

Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland (USA)
Bromophenol blue	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMF	Serva, Heidelberg
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
ISO propanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
PEG 200	Sigma, Taufkirchen
PFA	Merck, Darmstadt
RNase freies H ₂ O	Ambion, Austin (USA)
SDS	Sigma, Taufkirchen
Sucrose	Sigma, Taufkirchen
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Xylene cyanol ff	Sigma, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt

II.1.2. Medikamente

Dynastat [®]	Pharmacia, Erlangen
Forene [®]	Abbott, Wiesbaden
GW 501516	Merck, Darmstadt
Ketavet [®]	Pharmacia, Erlangen

NaCl 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg
NOC-12	Merck, Schwalbach
ONO AE1-259-01	ONO Pharmaceutica, Osaka (J)
ONO AE1-329	ONO Pharmaceutica, Osaka (J)
ONO AE3-208	ONO Pharmaceutica, Osaka (J)
Rompun [®]	Bayer, Leverkusen
SC-236	Merck, Schwalbach
Spermine NONOate	Merck, Schwalbach
Troglitazone	Merck, Schwalbach
VIOXX [®]	Merck Sharp & Dohme, Hertfordshire (UK)

II.1.3. Enzyme und Primer

10x PCR Puffer	Sigma, Taufkirchen
100 Base-Pair-Ladder	Amersham, Buckinghamshire (UK)
dNTP	Amersham, Buckinghamshire (UK)
F-Primer	Eurogentec, Seraing (B)
Neo-Primer	Eurogentec, Seraing (B)
Proteinkinase K	Invitrogen, Karlsruhe
R-Primer	Eurogentec, Seraing (B)
Taq DNA Polymerase	Sigma, Taufkirchen

II.1.4. Instrumente und Apparaturen

Einwegmesser	Heraeus Kulzer, Wehrheim /Ts.
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gelbild-Dokumentationseinrichtung	Vilber Lourmat, Marne la Vallée (F)
Gelelektrophoresekammer	Owl Scientific, Woburn (USA)
Labor(kühl)zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Ofen	Hybaid, Teddington (UK)
PCR-Gerät	Biometra, Göttingen

Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Schneidemaschine	Leica Instruments, Nussloch
Spritzen	B.Braun, Melsungen
Stromversorgungsgerät	Consort, Turnhout (B)
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage	Kern & Sohn, Balingen – Frommern
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	Leica Instruments, Nussloch

II.1.5. Sonstige Materialien

Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einbettkasten	medite, Burgdorf
Eosin Y	Sigma, Taufkirchen
Hematoxylin	Sigma, Taufkirchen
Objektglas – Kleber	Merck, Darmstadt
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafin	medite, Burgdorf

II.1.6. Software

BioCapt MW V.11.01	Vilber Lourmat, Marne la Vallée (F)
Prism 4	GraphPad Software, San Diego (USA)
SPOT Advanced V.3.4.5.	Diagnostic Instruments, Sterling Heights (USA)

II.1.7. Tiere

Die verwendeten Tiere waren Standardlabormäuse, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. Für die hier beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen lag eine Tierversuchsgenehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen vor (V54-19CL0-15MR20/14).

Zum Einsatz kamen hier:

C57BL6-Männchen und -Weibchen
 COX-2^{-/-}-Männchen
 COX-2^{+/-}-Weibchen
 EP-2^{-/-}-Männchen und -Weibchen

II.2. Methoden

II.2.1. Spritzschema

Es hat sich gezeigt, dass das Gewicht der Mäuse linear zunimmt und jedem Tag PX ein Gewicht Y zugeordnet werden kann. Um einen schonenden Umgang mit den Tieren zu gewährleisten, wurde zur Bestimmung des zu injizierenden Volumens folgendes Schema benutzt. Dies gilt, wenn nicht anders angegeben, für alle Versuchsreihen.

<u>Tag</u>	<u>Gewicht</u>	<u>Volumen</u>
P1 - 3	2 g KG	20 µl/Maus
P4 - 6	3 g KG	20 µl/Maus
P7, P8	4 g KG	25 µl/Maus
P9, P10	5 g KG	25 µl/Maus
P11 - 14	6 g KG	30 µl/Maus
P15 - 18	7 g KG	35 µl/Maus
P19 - 21	8 g KG	35 µl/Maus

II.2.2. Zusammensetzung der Medikamente

II.2.2.1. ONO AE1-329 (EP-4-Agonist)

Die Stammlösung (SL) [20 µg/µl] ist 1:100 bzw. 1:25 mit Ethanol zu verdünnen. Daraus ergeben sich Arbeitslösungen (AL) von 200 ng/µl bzw. 800 ng/µl. Um eine Konzentration von 40 ng/g KG bzw. 160 ng/g KG zu erhalten, sind diese erneut nach folgendem Schema mit NaCl zu verdünnen und das angegebene Volumen zu spritzen (s. Tab. 1).

II.2.2.2. ONO AE1-259-01 (EP-2-Agonist)

Für diesen Versuch ist die Stammlösung (SL) [20 µg/µl] 1:100 bzw. 1:25 mit Ethanol zu verdünnen. Es resultieren Arbeitslösungen (AL) in Konzentrationen von 200 ng/µl bzw. 800 ng/µl. Für eine Dosis von 40 ng/g KG bzw. 160 ng/g KG, sind diese erneut

nach folgendem Schema mit NaCl zu verdünnen und das angegebene Volumen zu spritzen (s. Tab. 1).

<u>Tag</u>	<u>Gewicht</u>	<u>Verhältnis</u>	<u>Volumen</u>
1-3	2g KG	1:50	20 µl/Maus
4-6	3g KG	1:33,3	20 µl/Maus
7,8	4g KG	1:31,25	25 µl/Maus
9,10	5g KG	1:25	25 µl/Maus
11-14	6g KG	1:25	30 µl/Maus
15-18	7g KG	1:25	35 µl/Maus
19-21	8g KG	1:21,9	35 µl/Maus

Tab. 1; Verdünnungsschema ONO AE1-329 bzw. ONO AE1-259-01

II.2.2.3. ONO AE1-329 (EP-4-Agonist) *plus* ONO AE1-259-01 (EP-2-Agonist)

Die Stammlösungen [20 µg/µl] sind im Verhältnis 1:25 (ONO-AE1-329) bzw. 1:6,25 (ONO-AE1-259-01) mit Ethanol zu verdünnen. So ergibt sich eine Arbeitslösung von 800 ng/µl (ONO-AE1-329) bzw. 3,2 µg/µl (ONO-AE1-259-01). Für eine Konzentration von 160 ng/g KG (ONO-AE1-329) bzw. 640 ng/g KG (ONO-AE1-259-01) ist die AL erneut nach folgendem Schema mit NaCl zu verdünnen und das angegebene Volumen zu spritzen (s. Tab. 1).

II.2.2.4. NOC-12 (NO-Donator)

Die SL (2mg NOC pro 100 µl NaOH 0,1 M) wird 100x mit 0,9% NaCl verdünnt. 1 µl dieser AL (200 µg/ml) sind pro g KG auf das entsprechende Gesamtvolumen mit 0,9% NaCl aufzufüllen (s. II.2.1.).

II.2.2.5. Spermine NONOate (NO-Donator)

Die SL (2,5 mg Spermine pro 100 µl NaOH 0,1 M bzw. pro 25 µl NaOH 0,1 M) ist 1:100 mit NaCl 0,9% zu verdünnen. 1 µl der entstandenen AL (250 µg/ml bzw. 1 mg/ml) füllt man pro g KG mit 0,9 % NaCl auf das Gesamtvolumen auf (s. II.2.1.).

II.2.2.6. Troglitazone (PPAR γ -Agonist)

Die SL (0,8 mg Troglitazone + 160 μ l PEG 200 + 8 μ l Triton 100) lag in einer Konzentration von 5 μ g/ μ l vor. Diese wurde nach folgender Tabelle mit 0,9% NaCl verdünnt und das angegebene Volumen wurde gespritzt (s. Tab. 2).

<u>Tag</u>	<u>Gewicht</u>	<u>Verhältnis</u>	<u>Volumen</u>
1-3	2g KG	1:250	20 μ l/Maus
4-6	3g KG	1:166	20 μ l/Maus
7,8	4g KG	1:156	25 μ l/Maus
9,10	5g KG	1:125	25 μ l/Maus
11-14	6g KG	1:125	30 μ l/Maus
15-18	7g KG	1:125	35 μ l/Maus
19-21	8g KG	1:110	35 μ l/Maus

Tab. 2; Verdünnungsschema Troglitazone

II.2.2.7. ONO AE3-208 (EP-4-Antagonist)

Die SL [20 μ g/ μ l] ist 1:10 mit Ethanol zu verdünnen. Daraus ergibt sich eine AL von 2 μ g/ μ l. Diese wurde zu folgenden Verhältnissen mit 0,9% NaCl verdünnt und das angegebene Volumen gespritzt (s. Tab. 3).

<u>Tag</u>	<u>Gewicht</u>	<u>Verhältnis</u>	<u>Volumen</u>
1-3	2g KG	1:50	20 μ l/Maus
4-6	3g KG	1:36	20 μ l/Maus
7,8	4g KG	1:29	25 μ l/Maus
9,10	5g KG	1:25	25 μ l/Maus
11-14	6g KG	1:27	30 μ l/Maus
15-18	7g KG	1:25	35 μ l/Maus
19-21	8g KG	1:22	35 μ l/Maus

Tab. 3; Verdünnungsschema ONO AE3-208

II.2.2.8. SC-236 (COX-2-Inhibitor)

Die SL (10 mg SC + 1 ml DMSO) ist 1:2 mit Ethanol zu verdünnen. Von dieser resultierenden AL [5 mg/ml] sind 0,5 µl pro g KG auf das entsprechende Gesamtvolumen mit 0,9 % NaCl aufzufüllen (s. II.2.1.).

II.2.2.9. Parecoxib (COX-2-Inhibitor)

Die SL (20 mg Parecoxib + 1 ml NaCl) ist 1:16 mit 0,9 % NaCl zu verdünnen. Von der sich ergebenden AL [1,25 µg/µl] sind 2 µl pro g KG auf das entsprechende Gesamtvolumen mit 0,9 % NaCl aufzufüllen (s. II.2.1.).

II.2.2.10. GW 501516 (PPARδ-Agonist)

Die SL (1 mg GW + 500 µl DMSO) ist 1:5 mit Ethanol zu verdünnen. 0,5 µl pro g KG der resultierenden AL [400 ng/µl] sind auf das entsprechende Gesamtvolumen mit 0,9 % NaCl aufzufüllen (s. II.2.1.).

II.2.2.11. Rofecoxib (COX-2-Inhibitor) (Tränke)

Die SL (25 mg/5 ml Suspension) wird 1:10 mit H₂O verdünnt. Die sich ergebende AL [500 µg/ml] ist in eine Tränke zu füllen.

II.2.2.12. SC-236 (COX-2-Inhibitor) (Tränke)

Für diesen Versuch muss die Stammlösung (5 mg SC + 1,5 ml PEG 200 + 83 µl TWEEN 20) im Verhältnis 1:250 bzw. 1:100 mit H₂O verdünnt werden. So ergeben sich Arbeitslösungen von 12 µg/ml bzw. 30 µg/ml. Diese sind in Tränken zu füllen.

II.2.2.13. Spermine NONOate (NO-Donator) (Tränke)

40 µl der SL (1 mg Spermine + 1 ml NaOH 0,1 M) sind mit 20 ml H₂O zu mischen und in eine Tränke zu geben.

II.2.3. Verabreichen der Medikamente

II.2.3.1. Spritzen der Mäuse

Bis auf wenige Ausnahmen (s. II.2.3.2.) bekamen die Tiere alle Präparate i.p. bzw. s.c. verabreicht. Dazu wurden die Mäuse meist gegen 8 Uhr morgens das erste Mal, und ca. 10 Stunden später am Abend das zweite Mal gespritzt. Hierzu wurden die Jungen für diese Zeit von der Mutter getrennt und direkt nach erfolgtem Spritzvorgang wieder zurückgesetzt.

Von Tag P1 bis P5 erfolgte die Injektion mittels Insulinspritze subcutan in eine Hautfalte zwischen den Schulterblättern, nachdem die Einstichstelle zuvor mit Alkohol desinfiziert wurde. Ab Tag P6 bis P21 wurde die Spritze intraperitoneal verabreicht, ebenfalls nach vorheriger Desinfektion. Dazu sind die Mäuse durch Griff in den Nacken und Fixieren des Schwanzes geschickt in der Hand aufzuspannen.

Auf Grundlage des oben aufgeführten Schemas (s. II.2.1.) wurde den Mäusen an den jeweiligen Tagen das entsprechende Gesamtvolumen gespritzt.

II.2.3.2. Versuche über die Tränke

Neben Versuchen, bei denen die Präparate direkt den Jungen injiziert wurden, erfolgten auch Versuche, bei denen die Präparate über die Tränke in das Muttertier und weiter über die Muttermilch in die Jungtiere gelangte.

SC-236 und Rofecoxib wurden in den oben angegebenen Konzentrationen in eine lichtschutzverpackte Trinkflasche gegeben und alle 3 Tage erneuert. Um die Suspension des Rofecoxibs aufrechtzuerhalten, musste zusätzlich ein Magnetrührer eingesetzt werden, der dauerhaft lief.

Da Spermine NONOate in wässrigem Milieu eine relativ kurze Halbwertszeit ($t_{1/2} = 230$ min) hat, wurden diese Tränken täglich sowohl morgens als auch abends erneuert. Im Unterschied zu SC-236 und Rofecoxib bekam hier das Muttertier bereits ab Tag E6 bis Tag P21 die mit Spermine NONOate versetzte Tränke.

II.2.4. Genotypisierung

Da bei Zucht der Nachkommen immer ein COX-2^{-/-}-Männchen mit einem COX-2^{+/-}-Weibchen verpaart wurde, waren auch die Jungen nach den Mendel'schen Regeln entweder homo- oder heterozygot. Um den Genotyp der Jungtiere unterscheiden zu können, wurden um den Tag P14 den Mäusen Ohrmarken gesetzt und eine Schwanzbiopsie entnommen.

II.2.4.1. Isolation der DNA

- 1a) Zunächst werden die Gewebeproben in jeweils einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit 500 µl Schwanz-Lyse-Puffer versetzt

<u>Schwanz-Lyse-Puffer</u>	<u>auf 100 ml</u>
100 mM Tris-HCl (pH 8,5)	1,576 g
5 mM EDTA	0,1461 g
0,2 % SDS	0,2 g
200 mM NaCl	1,1688 g

- 1b) Zugabe von 5 µl 1/100 vol. Proteinase K (10 mg/ml)
- 2) Nun wird das Ganze bei 55°C über Nacht in einem Thermomixer geschüttelt
 - 3) Am nächsten Tag entnimmt man die Cups dem Thermomixer und zentrifugiert sie 10 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm
 - 4) Währenddessen Vorbereiten neuer Eppendorf-Cups und Befüllen mit 500 µl ISOpropanol
 - 5) Entnahme der Cups aus der Zentrifuge (s. Schritt 3). Der Überstand, der sich hier gebildet hat, wird abpipettiert und in das jeweilige neue Eppendorf-Cup aus Schritt 4 gegeben
 - 6) Die Cups werden nun solange auf einem Mini-Shaker gedreht, bis das DNA-Pellet sichtbar wird
 - 7) Bei 12000 rpm 10 - 20 Sekunden die Cups abzentrifugieren

- 8) Der Überstand, der hierbei entsteht, wird abpipettiert und verworfen. Das zurückbleibende DNA-Pellet wird durch Zugabe von 500 µl 70 %igen Ethanol und durch Drehen mit dem Mini-Shaker gewaschen
- 9) Erneutes Zentrifugieren des Cups für 5 Minuten bei 4°C und 13000 rpm
- 10) Der entstandene Überstand ist ebenfalls zu verwerfen und das DNA-Pellet mindestens 10 Minuten, bis alles Ethanol verdampft ist, an der Luft zu trocknen
- 11) Abschließend muss das Pellet in 250 µl TE durch Drehen auf dem Mini-Shaker bei Raumtemperatur gelöst werden, um es dann für 1 - 2 Stunden bei 55°C im Thermomixer zu schütteln

II.2.4.2. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, gezielte DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, zu amplifizieren. Die Stränge der Ziel-DNA werden durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt. Danach wird die Reaktion abgekühlt, um die Hybridisierung der Primer zu erlauben. Von diesen ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTP neue komplementäre DNA-Stränge. Dieser Zyklus wird 35-mal wiederholt, sodass es zu einem exponentiellen Anstieg der Produkte kommt.

- 1) Zunächst werden entsprechende PCR-Cups beschriftet und mit jeweils 2 µl DNA befüllt
- 2) Ansetzen des Mastermixes auf Eis bzw. Kühlplatte (n+1)

Taq-Puffer	2 µl
2 mM dNTP	2 µl
F-Primer (1:10)	1 µl
R-Primer (1:10)	1 µl
Neo-Primer (1:10)	1 µl
RNase-freies Wasser	10 µl
Taq-Polymerase	1 µl

- 3) Zugabe von 18 µl Mastermix zur DNA in die Cups

- 4) PCR-Ansatz auf Kühlplatte stehen lassen und Programm am Thermocycler starten. Wenn die Blocktemperatur 95°C erreicht hat, können die Cups in den Thermocycler gestellt und der Deckel geschlossen werden. Die PCR startet nun mit folgendem Programm:

94°C	5 Minuten
95°C	30 Sekunden
58°C	30 Sekunden
72°C	30 Sekunden
72°C	5 Minuten
4°C	Pause
35 Zyklen	

II.2.4.3. Gelzubereitung

Zum Gießen eines Gels von mittlerer Größe fügt man zu 75 ml 1x TAE, 1 g Agarose hinzu. Nun kocht man die Mischung solange in der Mikrowelle, bis keine Schlieren mehr zu erkennen sind und die Lösung völlig klar ist.

Anschließend sind noch 0,75 µl Ethidiumbromid hinzuzufügen, bevor man dazu übergeht, es in eine entsprechende Form zu gießen und einen passenden Probenkamm einzustecken.

Nach ca. 30 Minuten ist das Gel erstarrt und kann befüllt werden, um die Gelelektrophorese zu starten.

50x TAE

Tris-Base	242 g
100% Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
ad ddH ₂ O	1000 ml

II.2.4.4. Gelelektrophorese

Das vollkommen erstarrte Gel wird nun in die Trennkammer gelegt, wobei auf die korrekte Ausrichtung des Gels zu achten ist. Die Trennkammer wird dann solange mit 1x TAE befüllt, bis das Gel leicht damit bedeckt ist.

Die fertigen PCR-Produkte sind, ehe sie für die Elektrophorese verwendet werden können, noch mit jeweils 4 μl eines 6x Probenpuffers zu versetzen.

Bevor die Elektrophorese gestartet werden kann, müssen zuerst die mit dem Probenkamm geschaffenen Taschen befüllt werden. Dazu gibt man mit einer Pipette in die beiden äußeren Geltaschen 10 μl 100 Base-Pair-Ladder und in die dazwischen liegenden Taschen 7 μl des PCR-Produkts. Jetzt kann der Deckel der Trennkammer geschlossen und der Vorgang mit 140 V und 100 mA gestartet werden. Nach 30 - 40 Minuten sollten die Banden soweit gelaufen sein, dass sie ein verwertbares Bild ergeben.

6x Probenpuffer

Bromophenol blue 0,25%	0,025 g
Xylene cyanol ff 0,25%	0,025 g
Sucrose (w/v)	4 g
ad ddH ₂ O	100 ml

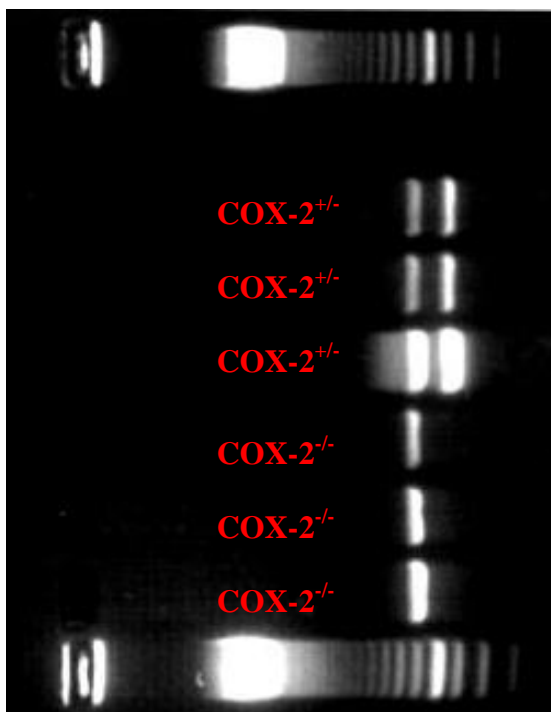


Abb. 1; Bild der Gelelektrophorese von drei COX-2^{+/-}-Tieren mit Doppelbande und von drei COX-2^{-/-}-Tieren mit Einzelbande

Dieses Bild wird nun unter UV-Licht mit der Dokumentationseinrichtung der Firma Vilber Lourmat dokumentiert und ausgewertet.

Dabei stellt das Bild mit einer Bande bei 905 bp ein COX-2^{-/-}-Tier, bzw. eine Bande bei 905 bp und bei 760 bp das Bild eines COX-2^{+/-}-Tieres dar. (s. Abb. 1)

II.2.5. Präparation der Mäuse

Am Tag P22 erfolgte die Präparation der Tiere. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit Forene[®] durch Inhalation narkotisiert. Anschließend wurden sie mit ca. 20 µl eines 1:1 Gemisches aus Ketavet[®] und Rompun[®] anästhesiert bzw. sediert.

Nun konnten die Tiere auf einer Styroporplatte mit Kanülen an den Extremitäten fixiert werden. Es erfolgte die sagitale Laparotomie mit anschließendem Aufsuchen und Durchtrennen der Vena cava inferior, um die Nieren weitgehend blutleer zu bekommen. Nach dem Ausbluten wurden nacheinander die Nieren aufgesucht, der Nierenpol durchtrennt, die Nieren entnommen und auf Eis gelegt. Zusätzlich erfolgte noch auf gleiche Art und Weise die Entnahme des Herzens.

Um die Ratio aus Nieren- und Körpergewicht zu bestimmen, wurden die Organe mit einer Analysenfeinwaage direkt abgewogen. Die Kadaver wurden der entsprechenden Verwertung zugeführt.

II.2.6. Fixieren der Organe

Bevor die Organe fixiert werden, teilt man die Nieren zuerst in der Mitte. Jeweils eine Hälfte der linken, wie auch eine Hälfte der rechten Niere wurden in mit 4% Paraformaldehyd gefüllte Eppendorf-Cups gegeben. Die jeweils anderen beiden Hälften wurden in ein Carnoy-Gemisch gelegt bzw. kryofixiert. Die Herzen sind ebenfalls in einem Kryo-Tube kryofixiert.

Während die kryofixierten Organe anschließend direkt bei -80°C gelagert werden können, lässt man die Organe in Paraformaldehyd bzw. Carnoy über Nacht fixieren, ehe sie am nächsten Tag in Alkohol umgebettet werden. Dabei gibt man die mit Paraformaldehyd fixierten Präparate in mit 70% Ethanol gefüllte Eppendorf-Cups, mit

Carnoy fixierte in mit 100% Ethanol gefüllte Cups. Nun können auch diese Präparate auf Dauer im Kühlschrank gelagert oder zur weiteren Bearbeitung in Parafin eingebettet werden.

Carnoy's Fix

100% Ethanol	150 ml
Chloroform	75 ml
100% Essigsäure	25 ml

4% Paraformaldehyd

Paraformaldehyd	4g
PBS	100 ml
bei 70°C	

II.2.7. Parafineinbetten der Organe

Zum Parafineinbetten und demnach zur weiteren Auswertung wurden die mit Paraformaldehyd fixierten linken Nierenhälften verwendet. Da diese in 70% Ethanol lagerten, zum Parafineinbetten jedoch frei von Wasser sein müssen, erfolgte zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe. Dabei wurden sie jeweils in Falcon-Tubes hin und her geschwenkt.

- 1) Einlegen der Nieren für 1 Stunde in 80% Ethanol
- 2) Einlegen der Nieren für 1 Stunde in 95% Ethanol
- 3) Einlegen der Nieren für 1 Stunde in 100% Ethanol
- 4) Einlegen der Nieren für 1 Stunde in neues 100% Ethanol (Schritt 3 wiederholen)
- 5) Einlegen der Nieren für 1 Stunde Xylol
- 6) Einlegen der Nieren für 1 Stunde neues Xylol (Schritt 5 wiederholen)
- 7) Nun werden die Nieren aus den Falcon-Tubes geholt und in entsprechende Einbettkästen gelegt. Jetzt werden alle Kästen in ein Gefäß mit 62°C heißem Parafin gegeben und für eine Stunde in einem Ofen mit ebenfalls 62°C gestellt
- 8) Nach dieser Zeit holt man das Gefäß mit den Kästen wieder aus dem Ofen, nimmt die Kästen nacheinander aus dem Gefäß und gibt diese in ein zweites, mit

frischem, 62°C heißem Parafin gefülltes Gefäß. Auch dieses neue Gefäß mit den Kästen darin wird für 1 Stunde bei 62°C in den Ofen gestellt

- 9) Nach dieser weiteren Stunde werden die Kästen mit den Nieren aus dem Ofen und nacheinander aus dem Parafin genommen. Man stellt die Organe dann mit der Schnittfläche nach unten in eine Gussform und gießt die Form mit heißem Parafin aus. Als spätere Haltevorrichtung im Mikrotom dient ein Teil des Einbettkastens, den man auf dem noch flüssigen Parafin platziert und mit dem Parafinblock aushärten lässt. Die Aushärtung geschieht auf einer Kühlplatte. Nach ca. 15 Minuten können die Parafinblöcke mit den Nieren darin aus der Gussform befreit werden und sind nun zum Schneiden bereit.

II.2.8. Schneiden der Organe

Zum Anfertigen histologischer Schnitte werden die Parafinblöcke in eine entsprechende Haltevorrichtung des Mikrotoms gespannt. Nun wird der Block mehrfach vertikal über ein Messer gezogen. Die ca. 4 µm starken Schnitte sind dann mittels Pinzette und Pinsel vorsichtig vom Messer zu trennen und auf ein ca. 44°C heißes Wasserbad zu legen. Dies dient der Streckung der Schnitte.

Vor und zwischen den Schnittvorgängen ist darauf zu achten, dass die Blöcke stets mit Eis oder einem feuchten Tuch gekühlt werden. Sollten die Schnitte einmal nicht exakt gelingen, empfiehlt es sich, den Parafinblock kurz anzuhauen.

Um die fertigen Schnitte auf einen Objektträger zu bekommen, taucht man diesen in das Wasserbad ein, fährt unter den Schnitt und lässt ihn durch vorsichtiges Anheben sanft darauf gleiten.

II.2.9. Färben der Organe

Bevor die Schnitte jedoch gefärbt werden können, müssen sie zunächst einmal in einem Trockenschrank bei 37°C über Nacht getrocknet werden. Am folgenden Tag sind die Präparate dann in mehreren Schritten zu färben. Zuerst befreit man sie vom

Parafin. Dazu stellt man die Objektträger in eine spezielle Halterung, mit deren Hilfe mehrere Träger in die entsprechenden Medien getaucht werden können.

- 1) Eintauchen der Schnitte für 5 Minuten in Xylol
- 2) Eintauchen der Schnitte für 5 Minuten in neues Xylol
Das Xylol aus den jeweiligen Schritten kann mehrfach verwendet werden
- 3) Eintauchen der Schnitte für 2 Minuten in Methanol
- 4) Eintauchen der Schnitte für 2 Minuten in frisches Methanol
Die 2 Minuten sind genau einzuhalten
- 5) Eintauchen der Schnitte für 2 Minuten in Leitungswasser
- 6) Eintauchen der Schnitte für 2 Minuten in neues Leitungswasser

Es erfolgt nun der eigentliche Färbeschritt.

- 1) Eintauchen der Präparate für 50 Sekunden in Hematoxylin Gill № 1
- 2) Präparate 1 - 2 Minuten unter fließendem Wasser bläuen
- 3) Eintauchen der Präparate für 30 Sekunden in Eosin Y
- 4) Präparate in ein leeres Gefäß stellen und dieses 3 - 4 mal mit Leitungswasser ausspülen

Es schließt sich die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe an.

- 1) Eintauchen der Schnitte für 1 Minute in 50% Ethanol
- 2) Eintauchen der Schnitte für 1 Minute in 70% Ethanol
- 3) Eintauchen der Schnitte für 1 Minute in 95% Ethanol
- 4) Eintauchen der Schnitte für 1 Minute in 100% Ethanol
- 5) Eintauchen der Schnitte für 3 Minute in frischen 100% Ethanol
- 6) Eintauchen der Schnitte für 1 Minute in Xylol

Abschließend werden die Objektträger noch mit einem Deckglas versehen, das mit Entellan[®]-Kleber befestigt wurde. Sobald der Kleber getrocknet ist, können die Schnitte unter dem Mikroskop betrachtet werden.

II.2.10. Mikroskopieren der Organe

Die Nieren wurden bei 200 facher Vergrößerung mit einem Mikroskop der Firma Leica betrachtet, wobei das Mikroskop an eine Kamera angeschlossen war, die wiederum mit einem Computer verbunden wurde. Über diesen Computer erfolgte anhand des Bilds der Kamera und mit Hilfe der Software SPOT Advanced V.3.4.5. die Auswertung der Schnitte. Dazu habe ich durch Fällen des Lots die einzelnen Durchmesser der Glomeruli und deren radiären Abstand von der Nierenkapsel bestimmt und dokumentiert. Hierbei gingen allerdings nur Abstände kleiner 58 µm in die Auswertung mit ein. Auf Grundlage der Formel $V = 0,5236 * d^3$ wurden die Volumina der einzelnen Glomeruli errechnet.

Mit Hilfe der erwähnten Apparatur wurden auch Photos zur weiteren Dokumentation angefertigt.

II.2.11. Statistische Auswertung

Die statistische bzw. graphische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels der Software PRISM 4. Wie bereits erwähnt, flossen hier alle Kapseldistanzen kleiner 58 µm in die Berechnung ein.

Der Vergleich der Glomerulumvolumina und der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel erfolgte mit Hilfe des U-Tests nach Whitney-Mann, der deshalb gewählt wurde, weil weder symmetrische noch Normalverteilung für die Durchführbarkeit gefordert wird. Der U-Test vergleicht die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben. Ist er signifikant, ist davon auszugehen, dass sich die Mediane der zugrunde liegenden Populationen unterscheiden. Im 95% - Konfidenzintervall mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% im zweiseitigen Test.

III. Ergebnisse

III.1. COX-2^{-/-}

Für die histomorphologische Beschreibung der Niere wurden folgende Parameter herangezogen: **1.** Das Verhältnis bzw. die Ratio von Gesamtnierengewicht zum Körpergewicht der Maus, **2.** Das Volumen der Glomeruli, **3.** Der Abstand der Glomeruli vom kortikalen Rand, **4.** Die relative Verteilung der Glomeruli.

Die Nieren der COX-2^{-/-}-Mäuse zeigen am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $8,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,6 \cdot 10^{-3}$. Der Wildtyp weist eine Ratio von $14,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$ auf.

Die histomorphologische Analyse der Nieren ergab Volumina von $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ für die unbehandelten COX-2^{-/-}-Tiere und $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ für die Wildtyp-Tiere ($p < 0,001$, $N = 330$) (s. Abb. 1-4).

Bezüglich der Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel zeigte sich ein im Mittel signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen: unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$, Wildtyp-Tiere $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $N = 330$) (s. Abb. 1-4).

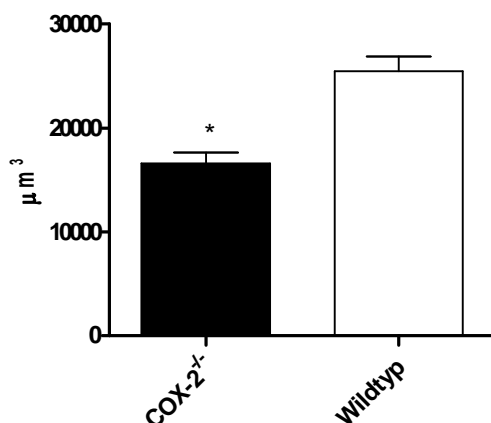


Abb. 1; Balkendiagramm der Glomerulumvolumina einer COX-2^{-/-}-Niere gegenüber einer WT-Niere, * $p < 0,05$ versus Wildtyp

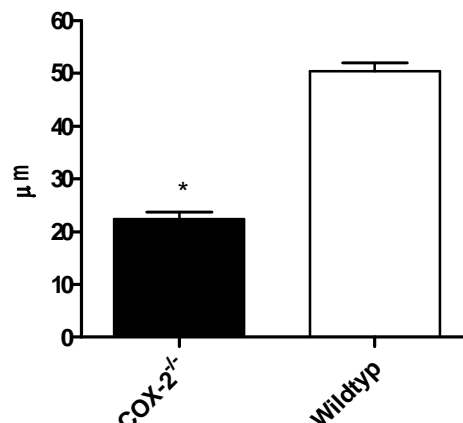


Abb. 2; Balkendiagramm der Kapseldistanzen einer COX-2^{-/-}-Niere gegenüber einer WT-Niere, * $p < 0,05$ versus Wildtyp

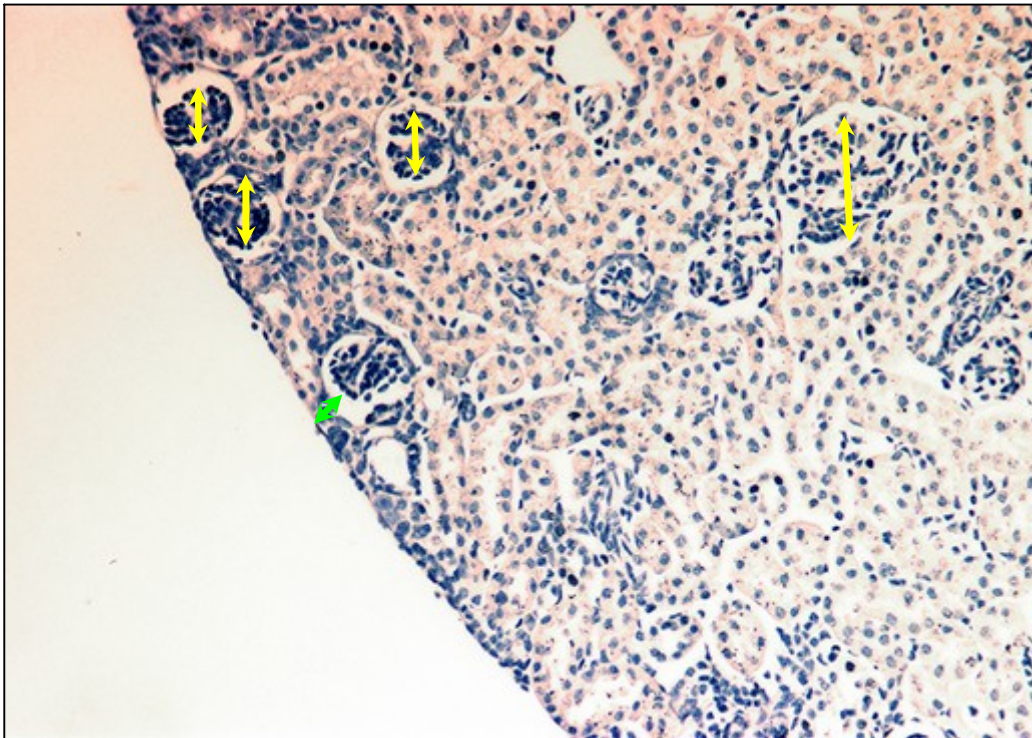


Abb. 3; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind die deutlich verkleinerten Glomeruli, die subkapsulär liegen und damit einen zu geringen Kapselabstand aufweisen. Im Organinneren ein gut entwickeltes Glomerulum; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

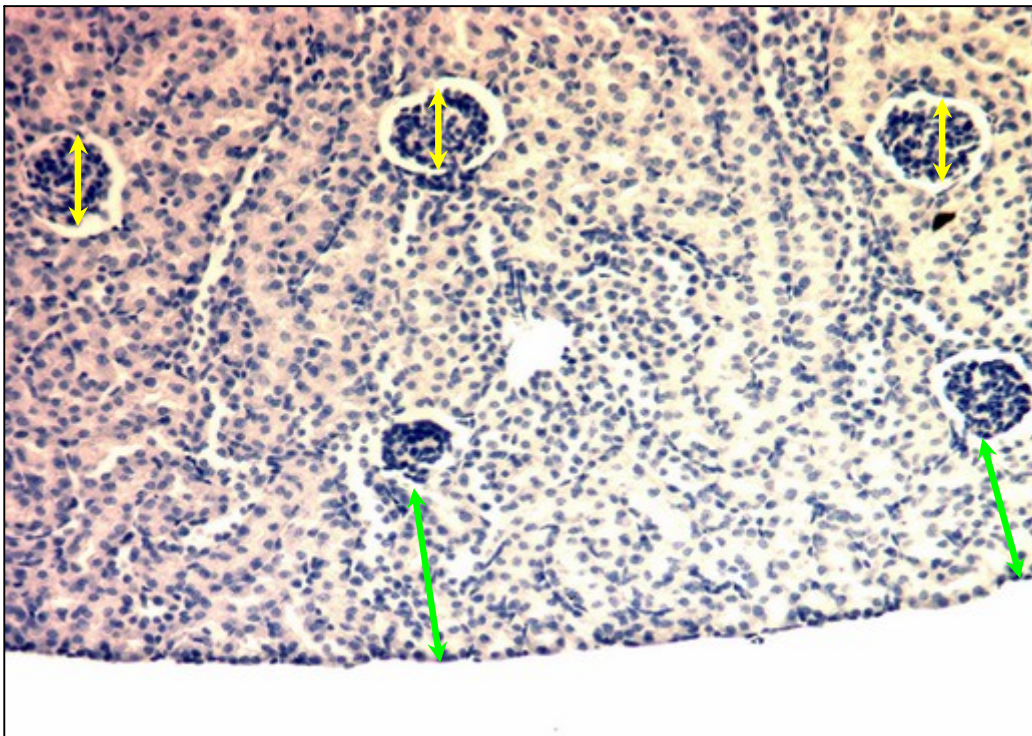


Abb. 4; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer Wildtyp-Maus in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind gut entwickelte Glomeruli mit ausreichendem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

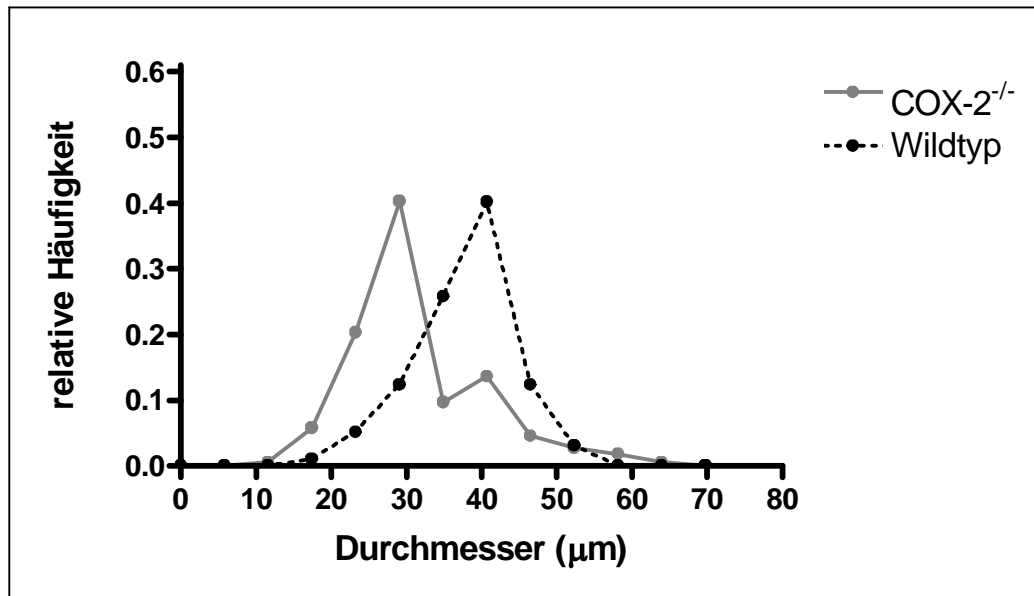


Abb. 5; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser einer COX-2^{-/-}-Niere im Vergleich zu einer WT-Niere

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so ergibt sich für das unbehandelte COX-2^{-/-}-Tier ein charakteristisches Bild mit einem Peak bei 29,08 µm und einem zweiten bzw. einer „Schulter“ bei 40,71 µm. Beim Wildtyp-Tier zeigt sich nur ein Peak bei 40,71 µm (s. Abb. 5).

III.1.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

	COX-2 ^{-/-}	Wildtyp
Glomerulumvolumen (µm ³)	16600 ± 1045	25440 ± 1422
Kapseldistanz (µm)	22,39 ± 1,38	50,42 ± 1,48
% Glomeruli innerhalb 58µm	49 %	6 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	8,5 ± 0,6	14,2 ± 0,9

III.2. COX-2-Inhibitoren

Ziel dieser Versuchsreihe war es zu überprüfen, ob selektive COX-2-Hemmer die Nephrogenese bei Wildtyp-Mäusen nachhaltig stören bzw. behindern und ob so pharmakologisch das Bild einer COX-2^{-/-}-Niere erzeugt werden kann. Zum Einsatz kamen dabei der experimentelle COX-2-Hemmer SC-236, sowie die klinisch genutzten Hemmstoffe Parecoxib und Rofecoxib. SC-236 wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen, 12 µg/ml und 30 µg/ml, über die Wassertränke, und in einem anderen Versuch intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Parecoxib wurde mit einer Dosis von 2,5 µg/g KG und Rofecoxib mit 500 µg/ml gegeben.

III.2.1.1. Applikation von SC-236 über die Tränke

In einer Konzentration von **12 µg/ml** in der Wassertränke ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $12,87 \cdot 10^{-3} \pm 0,57 \cdot 10^{-3}$.

Die histomorphologische Untersuchung der Nieren ergab für die Glomerulumvolumina Werte von: $22460 \pm 1273 \mu\text{m}^3$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Dies ergibt eine signifikante Differenz sowohl zwischen behandelten Wildtyp-Tieren und COX-2^{-/-}-Tieren ($p < 0,001$, $N = 340$) als auch zwischen den behandelten und den unbehandelten Wildtyp-Tieren ($p < 0,001$, $N = 340$) (s. Abb. 6, 16, 17).

Bei der histomorphologische Auswertung der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel misst man folgende Werte: $20,49 \pm 1,01 \mu\text{m}$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Damit zeigt sich zwischen den unbehandelten und den behandelten Wildtyp-Tieren ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$, $N = 136$) (s. Abb. 6, 16, 17).

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten Wildtyp-Tiere ein sowohl vom COX-2^{-/-}-Tier als auch vom unbehandelten Wildtyp-Tier abweichendes Bild. Die Verteilungskurve verläuft zudem deutlich niedriger (s. Abb. 7).

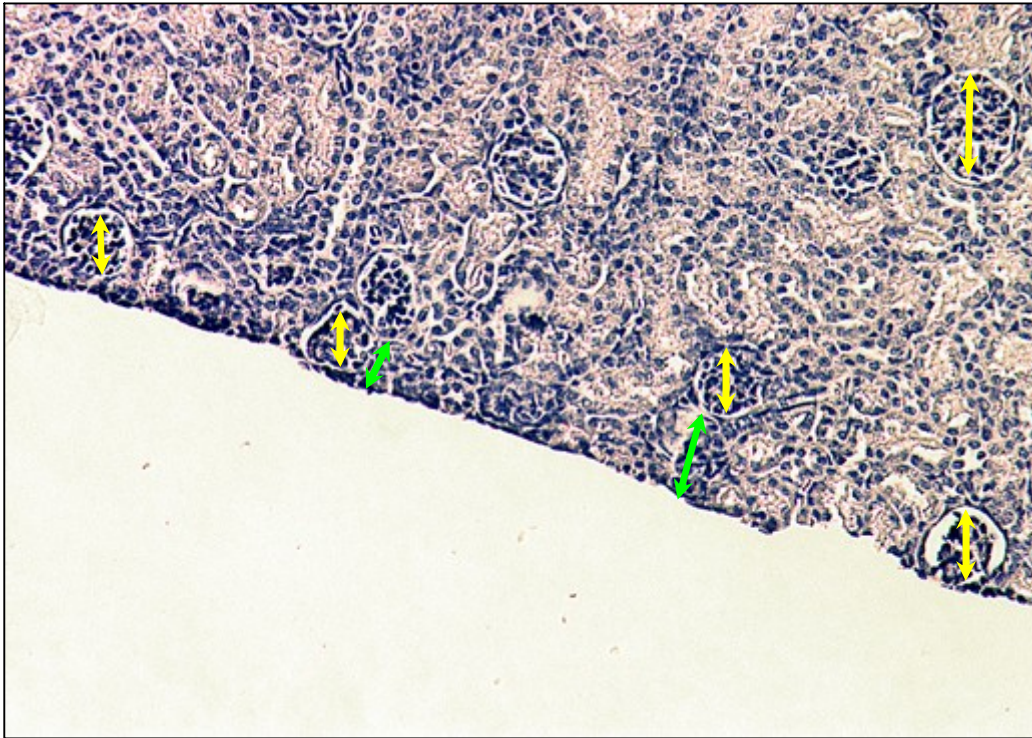


Abb. 6; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer Wildtyp-Maus, behandelt mit 12 µg/ml SC-236 über Wassertränke, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Inneren ein gut entwickeltes Glomerulum; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapselabstand

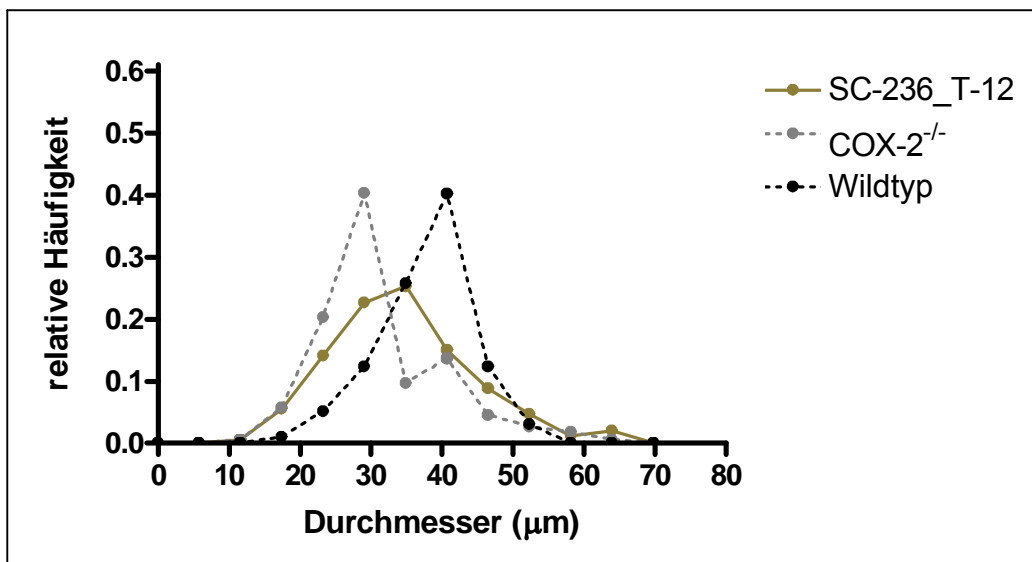


Abb. 7; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 12 µg/ml SC-236 (Tränke), im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

In einer Konzentration von **30 µg/ml** in der Wassertränke ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von im Schnitt $11,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$.

Die Analyse der Histomorphologie der Nieren in diesem Versuchsansatz ergab für die Glomerulumvolumina: $17620 \pm 446 \mu\text{m}^3$ (behandelte Wildtyp-Mäuse), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte Wildtyp-Mäuse) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (COX-2^{-/-}-Mäuse). Dies stellt einen signifikanten Unterschied sowohl zwischen behandelten und unbehandelten Tieren dar ($p < 0,001$, $N = 372$) als auch zwischen den behandelten und den COX-2^{-/-}-Tieren ($p < 0,001$, $N = 372$) (s. Abb. 8, 16, 17).

Bei der histomorphologische Untersuchung der Nieren zeigte sich für die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel: $16,06 \pm 1,32 \mu\text{m}$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Damit unterscheiden sich die behandelten Tiere sowohl signifikant von den unbehandelten ($p < 0,001$, $N = 153$) als auch von den COX-2^{-/-}-Tieren ($p = 0,001$, $N = 153$) (s. Abb. 8, 16, 17).

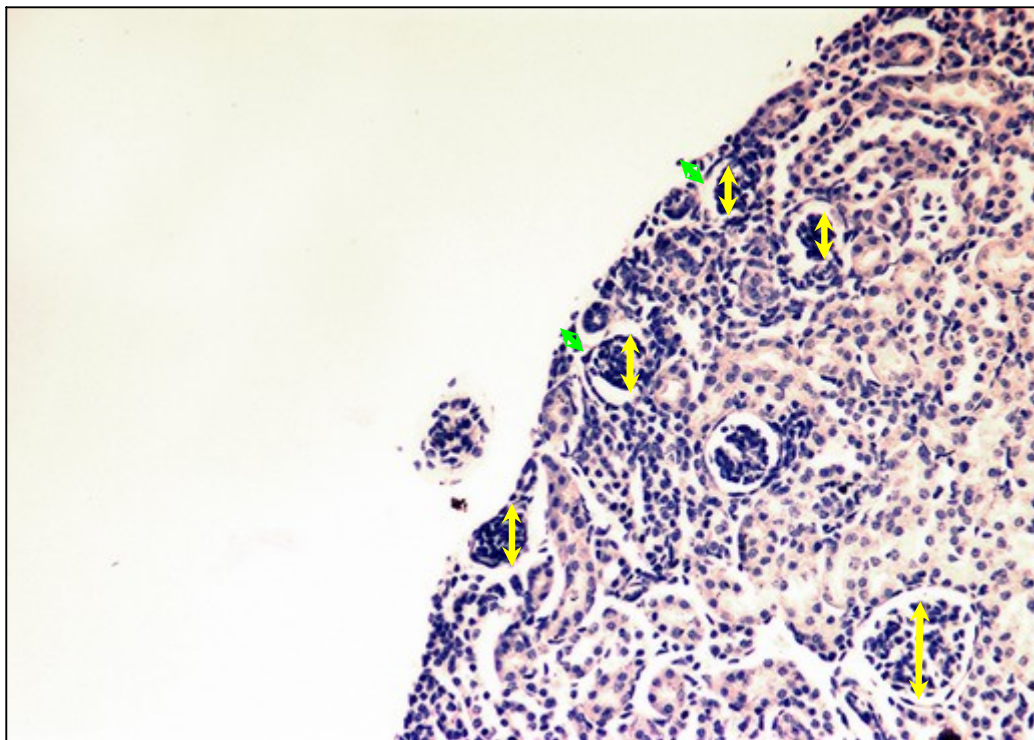


Abb. 8; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer Wildtyp-Maus, behandelt mit 30 µg/ml SC-236 über Wassertränke, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt deutlich verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Inneren ein gut entwickeltes Glomerulum; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

Auftragen der erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse ergibt für die behandelten Wildtyp-Tiere ein sowohl vom COX-2^{-/-}-Tier als auch vom unbehandelten Wildtyp-Tier abweichendes Bild. (s. Abb. 9)

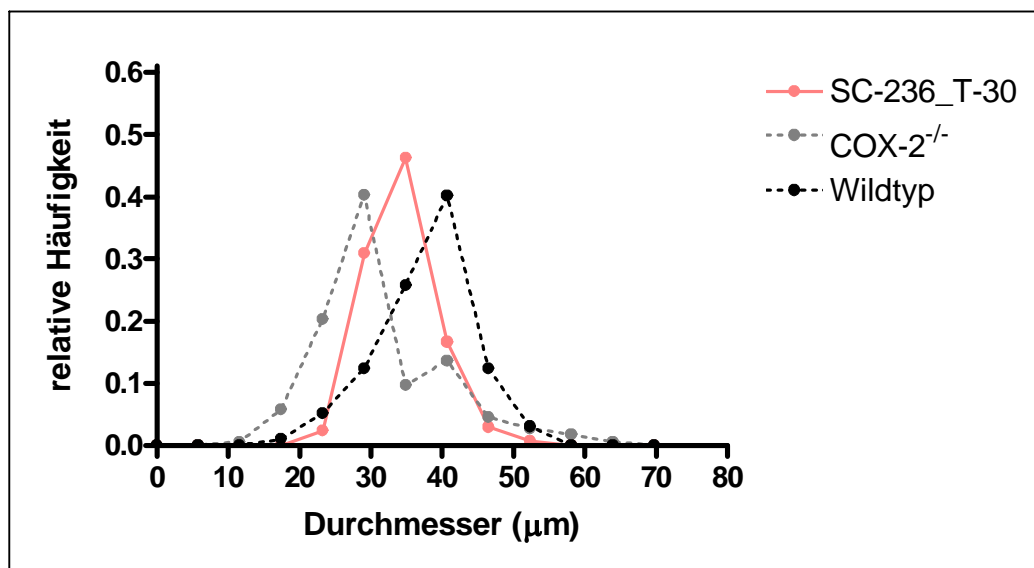


Abb. 9; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 30 µg/ml SC-236 (Tränke), im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}.

III.2.1.2. Applikation von SC-236 intraperitoneal

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Wirkung des i.p. verabreichten COX-2-Hemmers SC-236 untersucht.

In einer Konzentration von 2,5 µg/g KG zeigte sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $12,73 \cdot 10^{-3} \pm 0,11 \cdot 10^{-3}$.

Die Auswertung der histomorphologischen Daten der Glomeruli ergab Volumina von: $19450 \pm 503 \mu\text{m}^3$ (behandelte Wildtyp-Mäuse), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte Wildtyp-Mäuse) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (COX-2^{-/-}-Mäuse). Daraus ergibt sich sowohl ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten

Tieren ($p < 0,001$, $N = 321$) als auch zwischen den behandelten und den $\text{COX-2}^{-/-}$ -Tieren ($p < 0,001$, $N = 321$) (s. Abb. 10, 16, 17).

Untersuchungen zur Histomorphologie der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel ergaben: $40,18 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (behandelte Wildtyp-Mäuse), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (unbehandelte Wildtyp-Mäuse) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ ($\text{COX-2}^{-/-}$ -Mäuse). Auch hier ergibt sich daraus sowohl ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Tieren ($p = 0,001$, $N = 57$) als auch zwischen den behandelten und den $\text{COX-2}^{-/-}$ -Tieren ($p < 0,001$, $N = 57$) (s. Abb. 10, 16, 17).

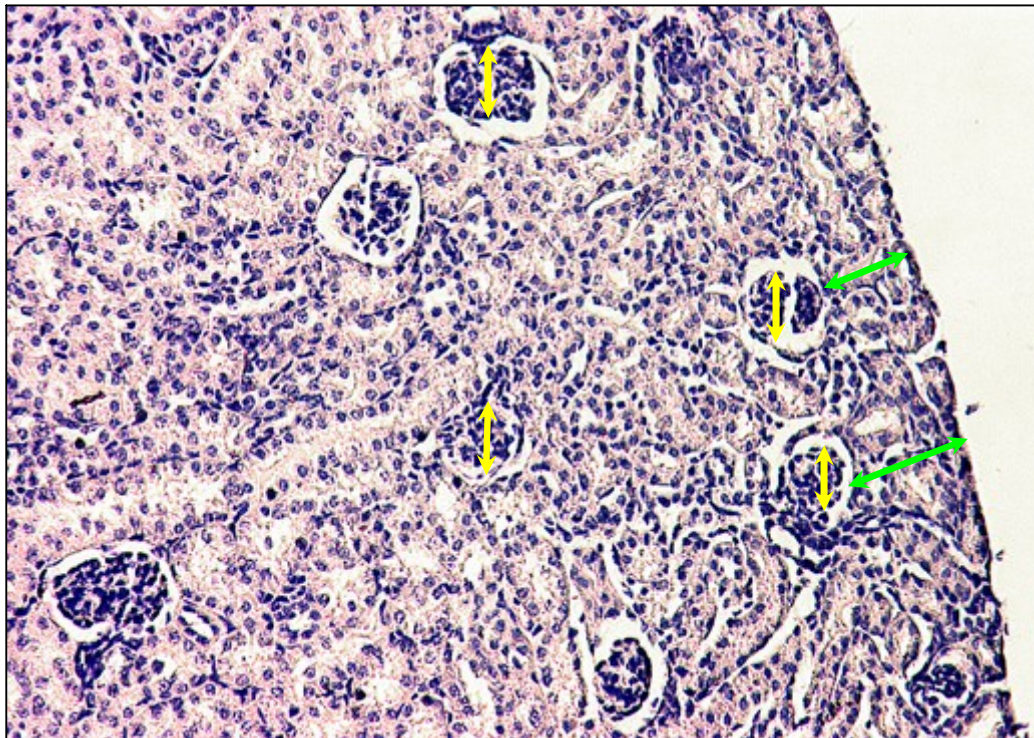


Abb. 10; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer Wildtyp-Maus, behandelt mit $2,5 \mu\text{g/g KG}$ SC-236 (i.p.), in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit mäßigem Kapselabstand; \updownarrow Glomerulumdurchmesser, \updownarrow Kapseldistanz

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten Wildtyp-Mäuse ein sowohl von den $\text{COX-2}^{-/-}$ -Mäusen als auch von den unbehandelten Wildtyp-Mäusen abweichendes Bild. (s. Abb. 11)

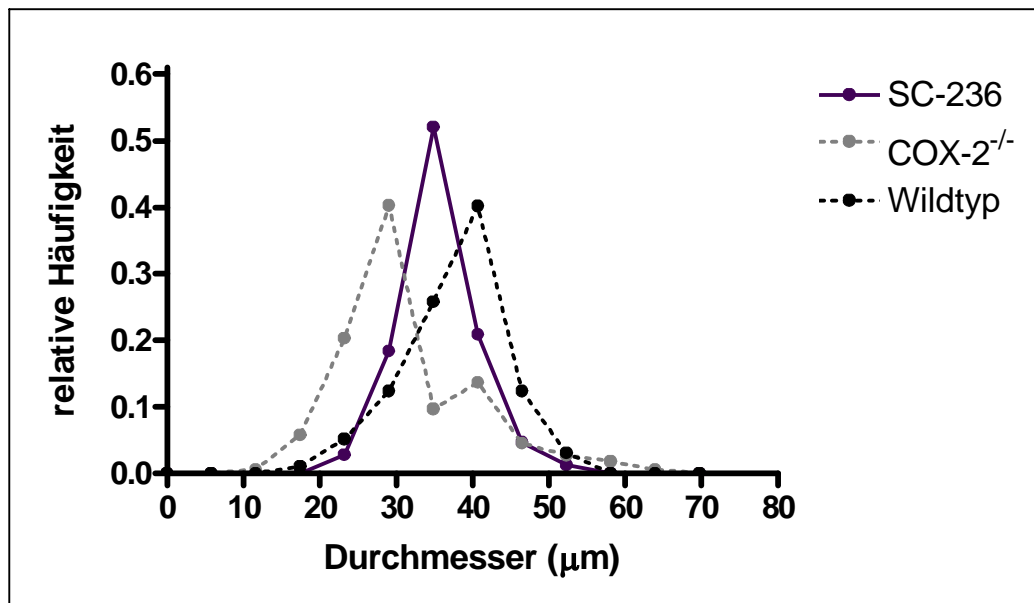


Abb. 11; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 2,5 µg/g KG SC-236 (i.p.), im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.2.1.3. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

COX-2-Hemmer	SC-236 (Tränke) (12 µg/ml)	SC-236 (Tränke) (30 µg/ml)	SC-236 (i.p.) (2,5 µg/g KG)
Glomerulumvolumen (µm ³)	22460 ± 1273	17620 ± 446	19450 ± 503
Kapseldistanz (µm)	20,49 ± 1,01	16,06 ± 1,32	40,18 ± 1,48
% Glomeruli innerhalb 58µm	37 %	45 %	18 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	12,87 ± 0,57	11,2 ± 0,5	12,73 ± 0,11

III.2.2. Applikation von Parecoxib

Im Folgenden wurde die differenzierungsstörende Wirkung zweier klinisch genutzter COX-2-Inhibitoren, Parecoxib und Rofecoxib, untersucht.

Nach Applikation von Parecoxib in einer Konzentration von 2,5 µg/g KG ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $14,27 \cdot 10^{-3} \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$.

Die histomorphologische Untersuchung der Nieren ergab für die Glomerulumvolumina Werte von: $17520 \pm 377 \mu\text{m}^3$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Dies ergibt eine signifikante Differenz sowohl zwischen behandelten Tieren und unbehandelten Tieren ($p < 0,001$, $N = 373$) als auch zwischen den behandelten und den COX-2^{-/-}-Tieren ($p < 0,001$, $N = 373$) (s. Abb. 12, 16, 17).

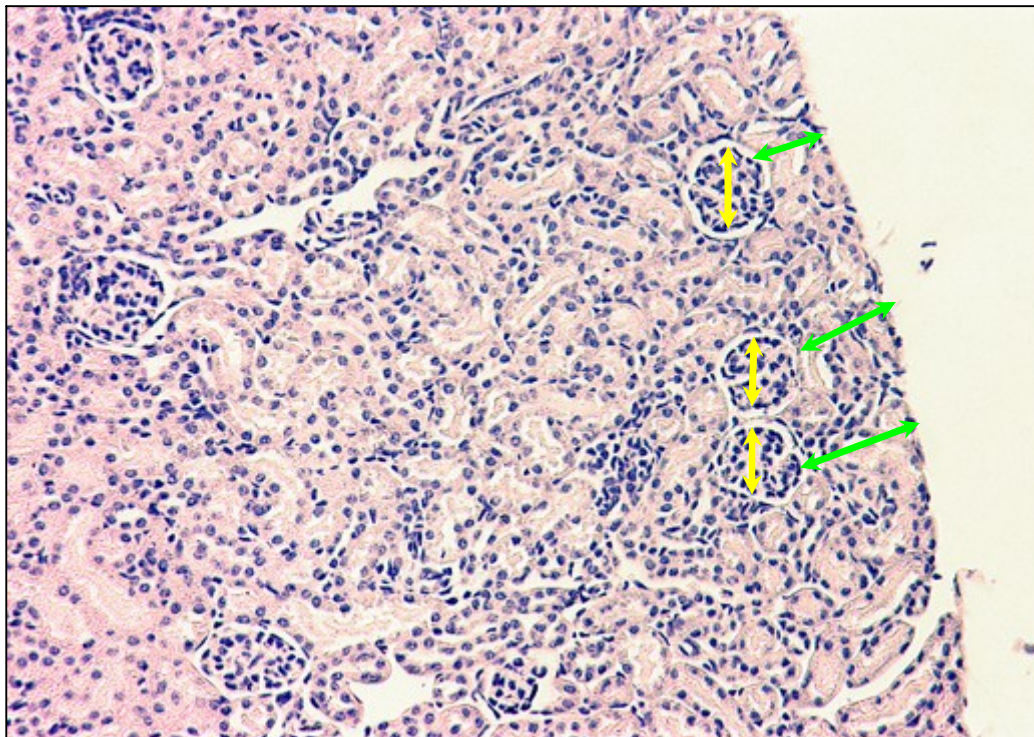


Abb. 12; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer Wildtyp-Maus, behandelt mit 2,5 $\mu\text{g/g}$ KG Parecoxib, in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind verkleinerte Glomeruli, mit mäßigem Kapselabstand; \downarrow Glomerulumdurchmesser, \uparrow Kapseldistanz

Bei der histomorphologische Auswertung der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel misst man folgende Werte: $42,02 \pm 0,93 \mu\text{m}$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Neben einer signifikanten Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ($p = 0,003$, $N = 59$), bedeutet dies zudem einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und COX-2^{-/-}-Tieren ($p < 0,001$, $N = 59$) (s. Abb. 12, 16, 17).

Auftragen der erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse ergibt für die behandelten Wildtyp-Tiere ein sowohl von den COX-2^{-/-}-Tieren als auch von den unbehandelten Wildtyp-Tieren abweichendes Bild. (s. Abb. 13)

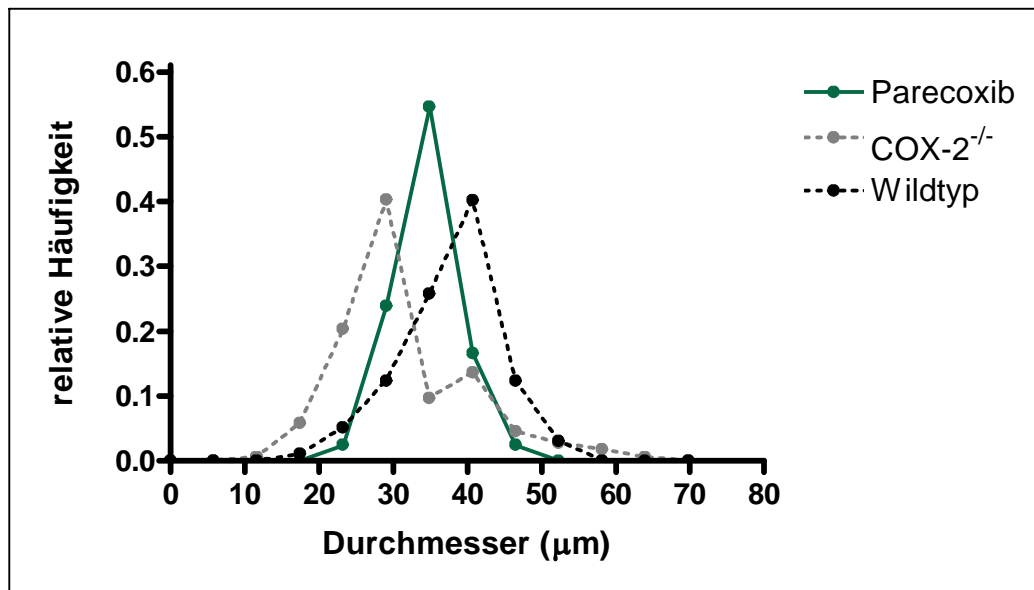


Abb. 13; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 2,5 µg/g KG Parecoxib, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.2.3. Applikation von Rofecoxib

In einer weiteren Versuchsserie wurde Rofecoxib hinsichtlich seiner Wirkung auf die Nephrogenese untersucht. Rofecoxib wurde in einer Konzentration von 500 µg/ml der Wassertränke zugefügt.

Nach Entnahme der Nieren am Tag P22 ergab sich eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $12,92 \cdot 10^{-3} \pm 0,43 \cdot 10^{-3}$.

Die Auswertung der Histomorphologie der Nieren in diesem Versuchsansatz ergab folgende Glomerulumvolumina: $17250 \pm 717 \mu\text{m}^3$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Daraus folgt eine signifikante Differenz sowohl von behandeltem versus un-

behandeltem Tier ($p < 0,001$, $N = 352$) als auch von behandelten versus $\text{COX-2}^{-/-}$ -Tieren ($p < 0,001$, $N = 352$) (s. Abb. 14, 16, 17).

Bei der histomorphologische Untersuchung der Nieren zeigte sich für die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel: $31,52 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (behandelte Wildtyp-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (unbehandelte Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ ($\text{COX-2}^{-/-}$ -Tiere). Damit unterscheiden sich die behandelten Tiere sowohl signifikant von den unbehandelten ($p = 0,001$, $N = 118$) als auch von den $\text{COX-2}^{-/-}$ -Tieren ($p < 0,001$, $N = 118$) (s. Abb. 14, 16, 17).

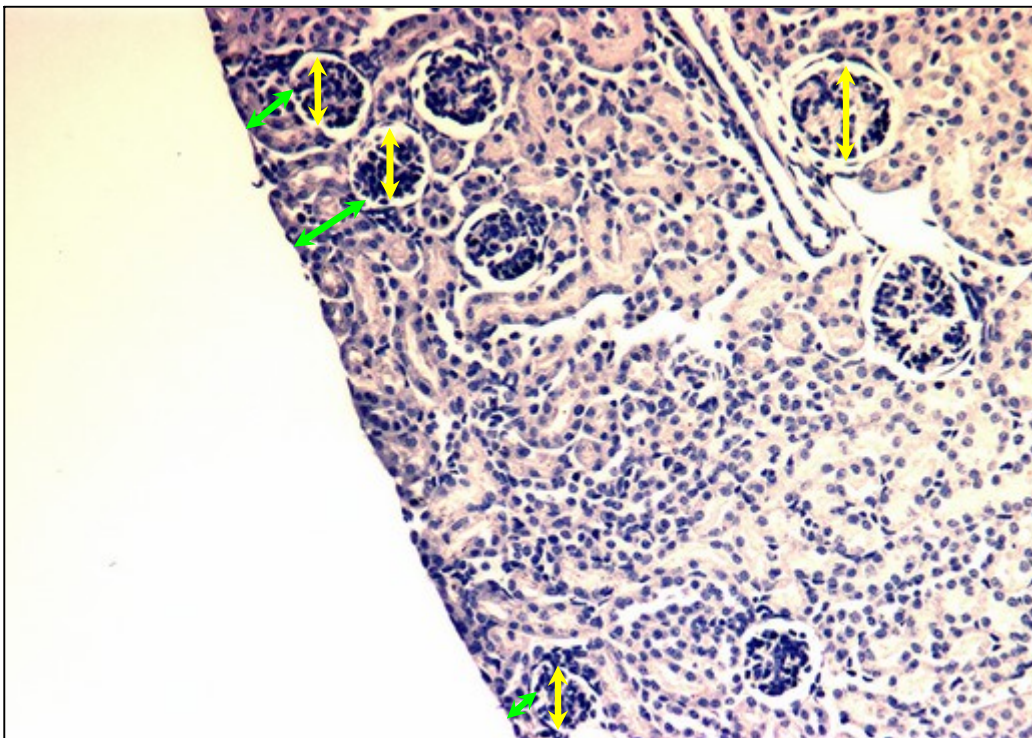


Abb. 14; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer Wildtyp-Maus, behandelt mit 500 µg/ml Rofecoxib über Wassertränke, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Inneren ein gut entwickeltes Glomerulum; \downarrow Glomerulumdurchmesser, \updownarrow Kapseldistanz

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten Wildtyp-Mäuse ein gering von den $\text{COX-2}^{-/-}$ -Mäusen abweichendes Bild. Jedoch ist die charakteristische „Schulter“ bei 40 µm nicht ausgeprägt. (s. Abb. 15)

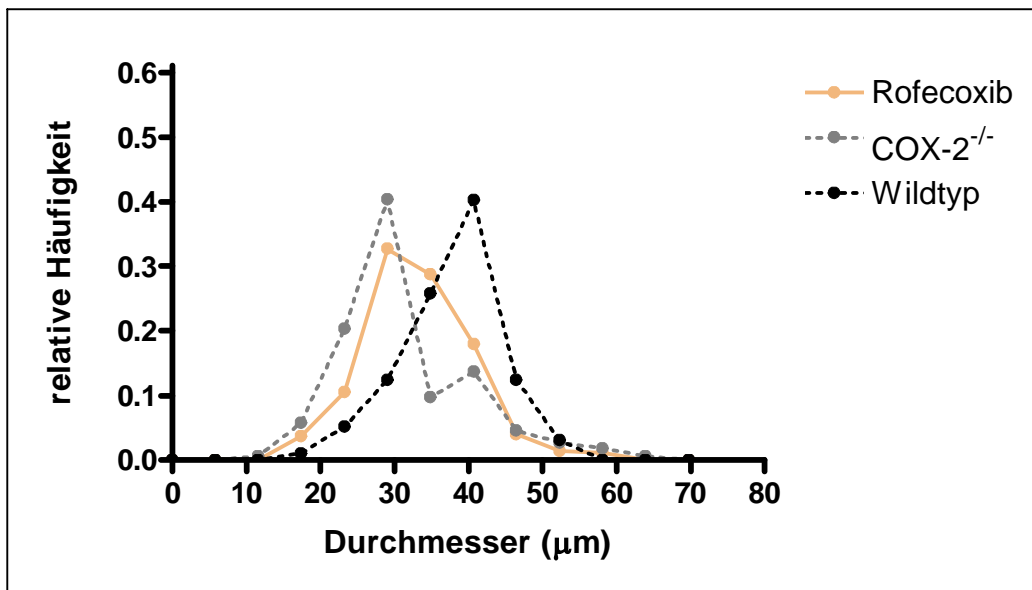


Abb. 15; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 500 µg/ml Rofecoxib (Tränke), im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.2.4. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

COX-2-Hemmer	Parecoxib (2,5 µg/g KG i.p.)	Rofecoxib (500 µg/ml im Trinkwasser)
Glomerulumvolumen (µm ³)	17520 ± 377	17250 ± 717
Kapseldistanz (µm)	42,02 ± 0,93	31,52 ± 1,3
% Glomeruli innerhalb 58µm	16 %	34 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	14,27 ± 0,8	12,92 ± 0,43

III.2.5. Vergleichende Zusammenstellung

Im Folgenden sind jeweils alle Glomerulumvolumina und Kapseldistanzen der Glomeruli in einem Balkendiagramm dargestellt.

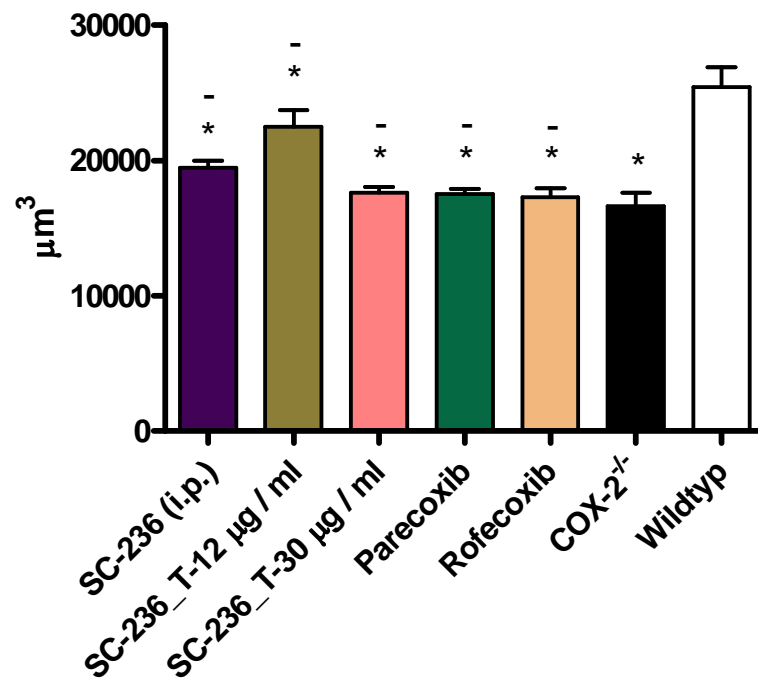


Abb. 16; Balkendiagramm der Glomerulumvolumina, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

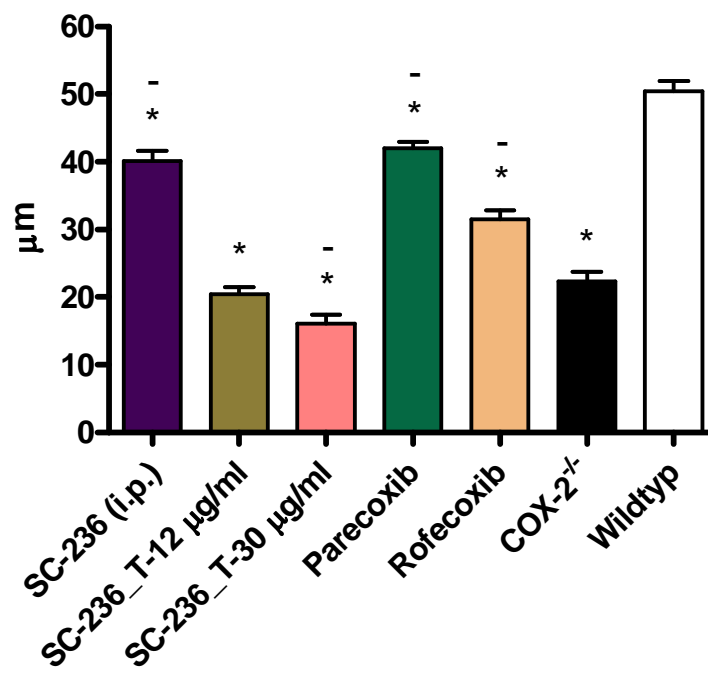


Abb. 17; Balkendiagramm der Kapseldistanzen, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

III.3. PGE₂-Rezeptoren

Für das Prostaglandin E₂ sind vier verschiedene Rezeptoren bekannt: EP-1, EP-2, EP-3, EP-4. Agonisten an EP-2-Rezeptoren, sowie Agonisten an EP-4-Rezeptoren wirken über einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration.

III.3.1. Applikation eines EP-2-Rezeptor-Agonisten

Zunächst wurden die Effekte des EP-2-Agonisten ONO-AE1-259-01 in zwei verschiedenen Konzentrationen, 40 ng/g KG und 160 ng/g KG, auf die Entwicklung der Niere untersucht. Auf die phänotypische Vitalität der Versuchstiere hatte die Substanzgabe über 21 Tage keinen Einfluss. Alle Tiere überlebten.

In einer Konzentration von **40 ng/g KG** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $10 \cdot 10^{-3} \pm 0,42 \cdot 10^{-3}$.

Die histomorphologische Analyse der Glomerulumvolumina ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren und Wildtyp-Tieren ($p < 0,001$, $N = 628$): $12920 \pm 304 \mu\text{m}^3$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere) (s. Abb. 20, 32, 33).

Bei der histomorphologischen Untersuchung der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel zeigte sich, dass sich das behandelte COX-2^{-/-}-Tier signifikant vom Wildtyp-Tier unterscheidet ($p < 0,001$, $N = 304$): $20,12 \pm 0,67 \mu\text{m}$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere) (s. Abb. 20, 32, 33).

Trägt man diese Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse ein kaum vom unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier abweichendes Bild. Jedoch verschwindet die charakteristische „Schulter“ bei 40 μm . (s. Abb. 21)

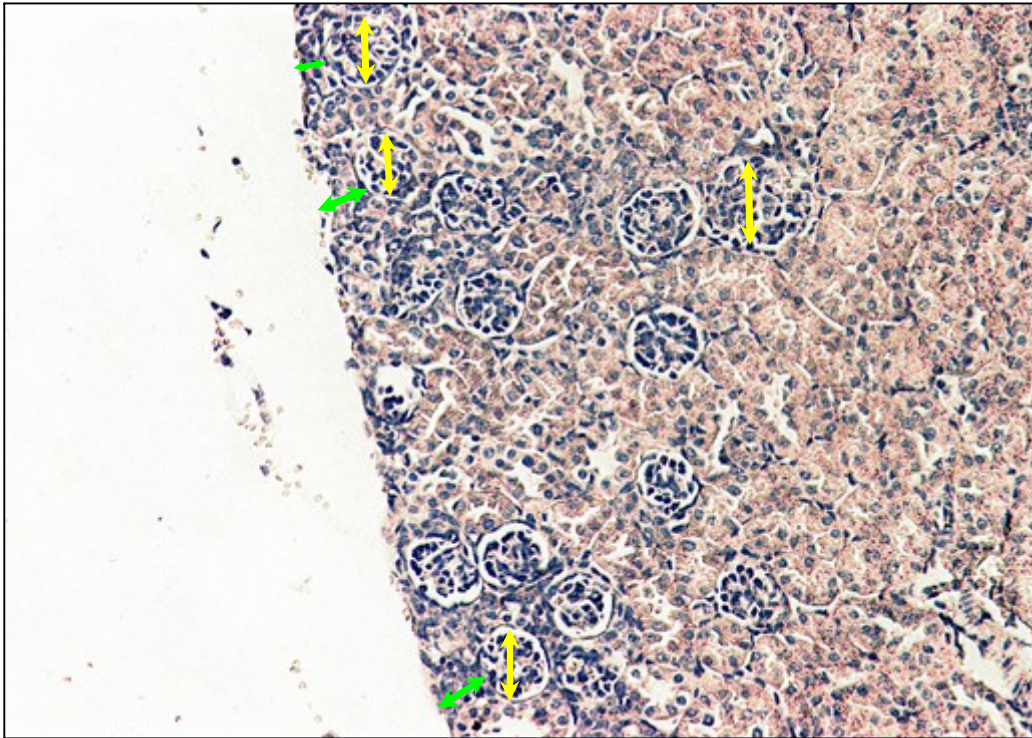


Abb. 20; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 40 ng/g KG ONO-AE1-259-01, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt deutlich verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Organinneren ein gut entwickeltes Glomerulum; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

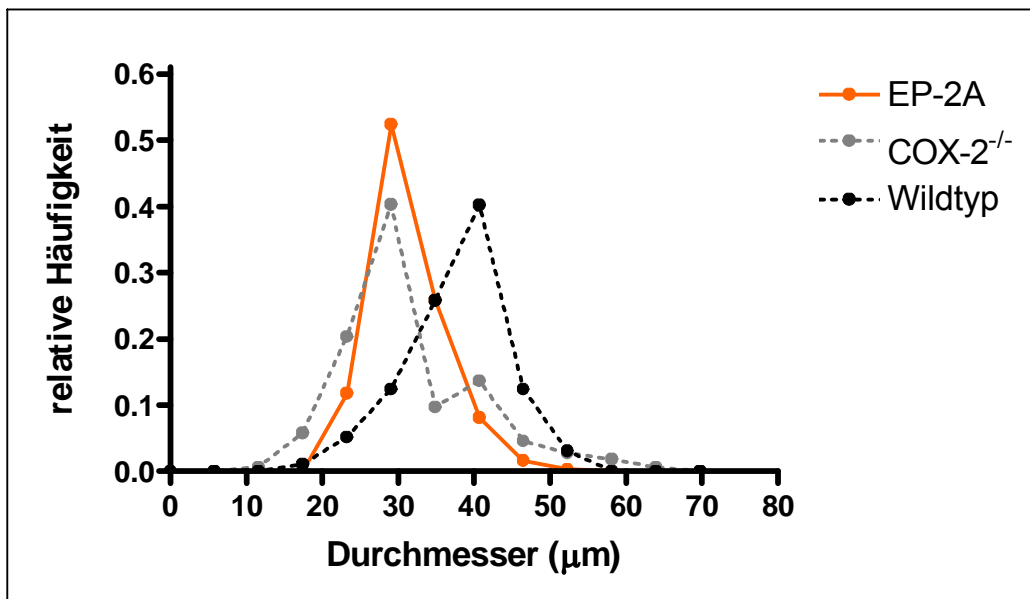


Abb. 21; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 40 ng/g KG ONO-AE1-259-01, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

In einer Konzentration von **160 ng/g KG** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $11,8 \cdot 10^{-3} \pm 0,15 \cdot 10^{-3}$.

Beim Vergleich der histomorphologischen Daten bezüglich der Glomerulumvolumina zeigen sich keine signifikanten Differenzen zwischen den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren ($p = 0,108$, $N = 418$): $26700 \pm 484 \mu\text{m}^3$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere) (s. Abb. 22, 32, 33).

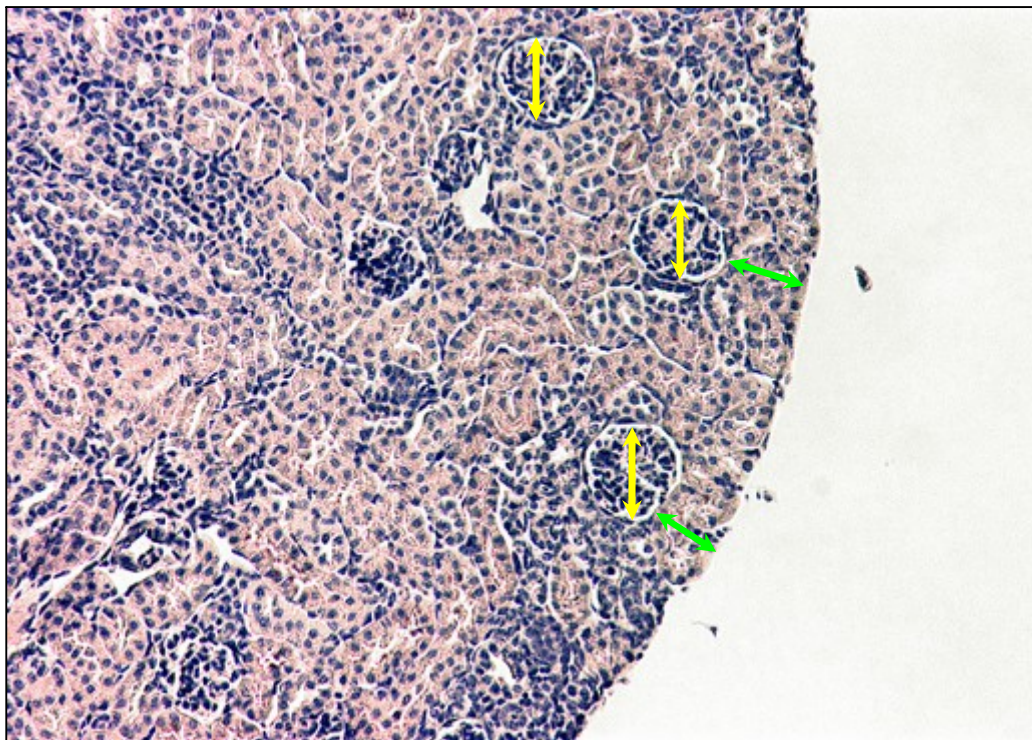


Abb. 22; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 160 ng/g KG ONO-AE1-259-01, in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind gut entwickelte Glomeruli, aber mit zu geringem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

Es finden sich aber signifikante histomorphologische Unterschiede zwischen den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren in Bezug auf die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel ($p < 0,001$, $N = 191$): $22,43 \pm 0,79 \mu\text{m}$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere) (s. Abb. 22, 32, 33).

Das Auftragen der Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse, zeigt ein für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse kaum vom Wildtyp-Tier abweichendes Bild. (s. Abb. 23)

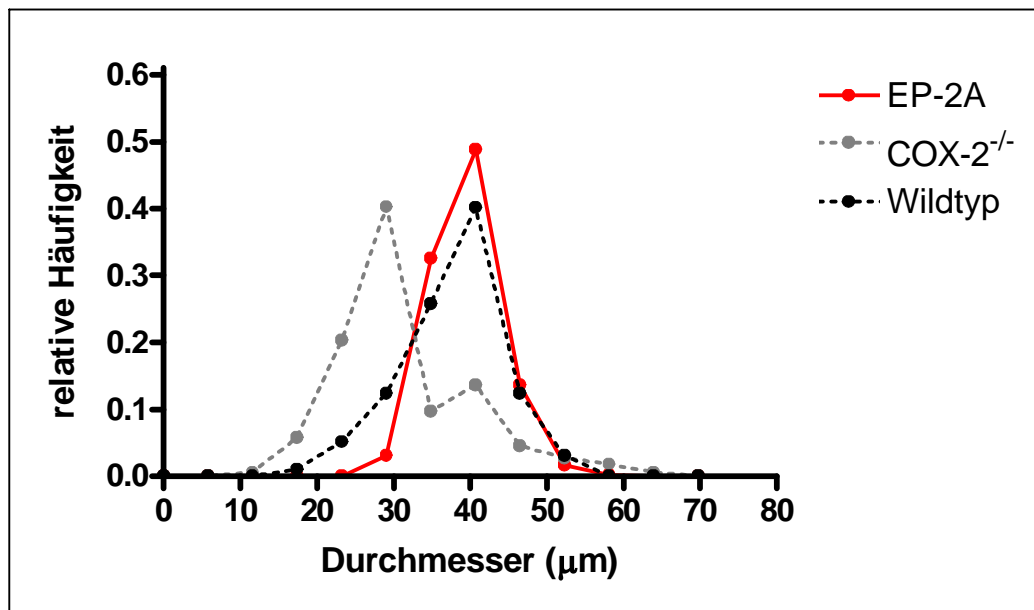


Abb. 23; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 160 ng/g KG ONO-AE1-259-01, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.3.1.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

Agonist	EP-2A ONO-AE1-259-01 (40 ng/g KG)	EP-2A ONO -AE1-259-01 (160 ng/g KG)
Glomerulumvolumen (µm ³)	12920 ± 304	26700 ± 484
Kapseldistanz (µm)	20,12 ± 0,67	22,43 ± 0,79
% Glomeruli innerhalb 58µm	48 %	46 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	10 ± 0,42	11,8 ± 0,15

III.3.2. Applikation eines EP-4-Rezeptor-Agonisten

Auch die Effekte des EP-4-Agonisten ONO-AE1-329 wurden hinsichtlich der Nierenentwicklung in zwei verschiedenen Konzentrationen, 40 ng/g KG und 160 ng/g KG, untersucht.

In einer Konzentration von **40 ng/g KG** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $12,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$.

Die Auswertung der histomorphologischen Daten der Glomeruli zeigt keinen signifikanten Unterschied von behandelten COX-2^{-/-}-Tieren versus Wildtyp-Tieren bezüglich ihrer Volumina ($p = 0,836$, $N = 333$): $24570 \pm 440 \mu\text{m}^3$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere) (s. Abb. 24, 32, 33).

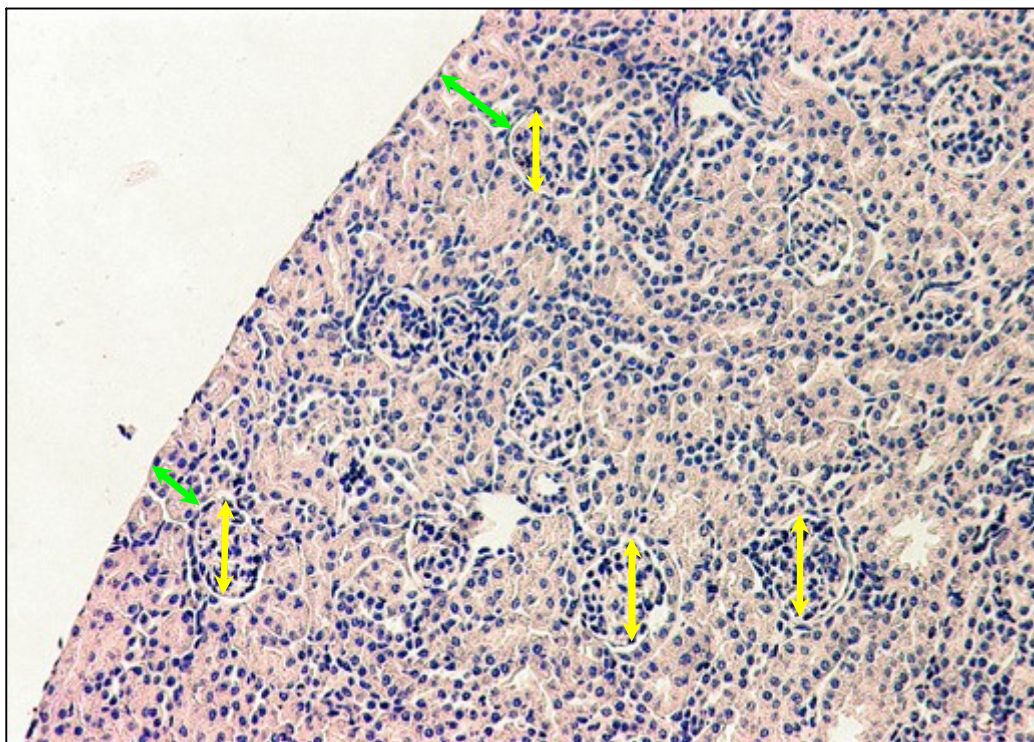


Abb. 24; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 40 ng/g KG ONO-AE1-329, in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind gut entwickelte Glomeruli, aber mit mäßigem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapselabstand

Bei der histomorphologische Auswertung der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel misst man folgende Werte: $35,44 \pm 0,77 \mu\text{m}$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere). Daraus ergibt sich eine signifikante Differenz zwischen behandelten COX-2^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$, $N = 102$). Zudem stellt dies eine signifikante Differenz zwischen behandelten COX-2^{-/-}-Mäusen und unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäusen dar ($p < 0,001$, $N = 102$) (s. Abb. 24, 32, 33).

Das Auftragen der erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse zeigt für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse ein kaum von den Wildtyp-Mäusen abweichendes Bild. (s. Abb. 25)

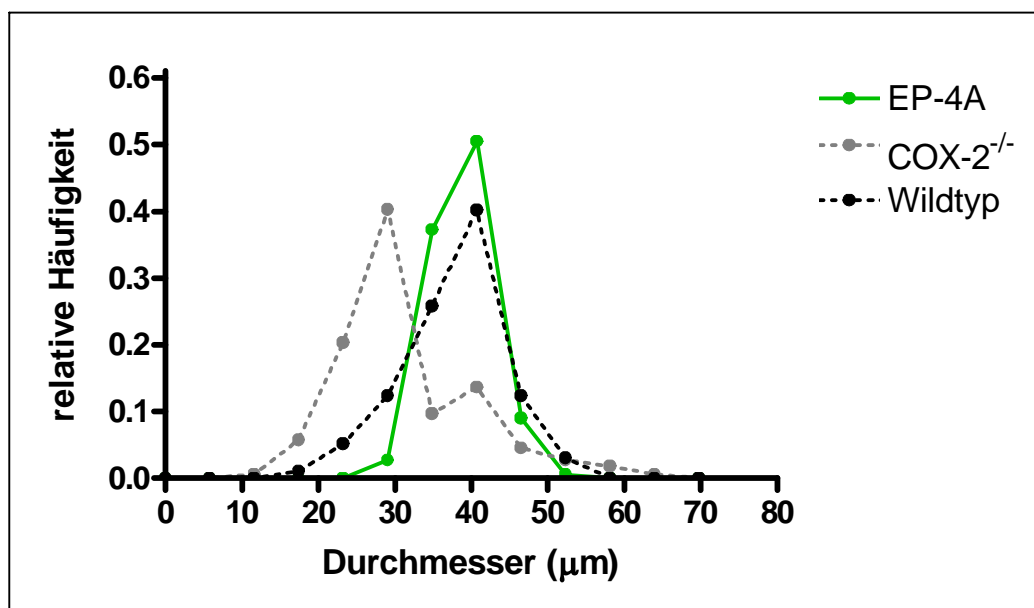


Abb. 25; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 40 ng/g KG ONO-AE1-329, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

In einer Konzentration von **160 ng/g KG** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $12,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$.

Die Analyse der Histomorphologie der Nieren in diesem Versuchsansatz ergab für die Glomerulumvolumina: $29680 \pm 637 \mu\text{m}^3$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere). Damit besitzen die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse ein signifikant höheres Glomerulumvolumen als die Wildtyp-Mäuse ($p < 0,001$, $N = 325$) (s. Abb. 26, 32, 33).

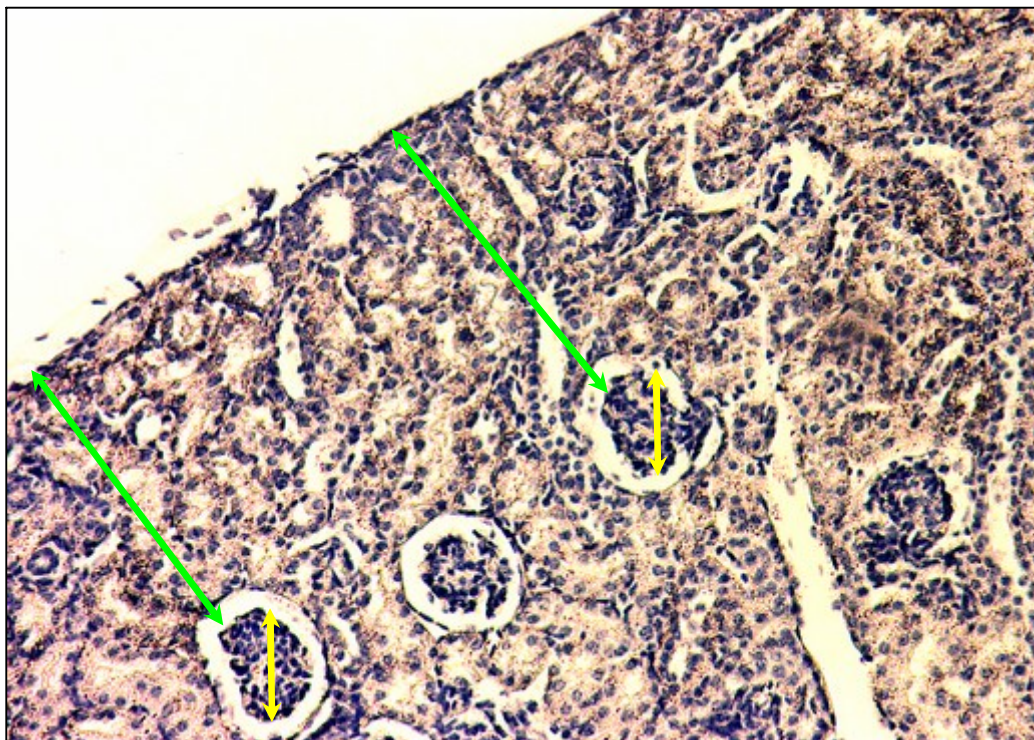


Abb. 26; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 160 ng/g KG ONO-AE1-329, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt gut entwickelte Glomeruli, mit großem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapselabstand

Bei der histomorphologische Untersuchung der Nieren ergaben sich für die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel: $34,67 \pm 1,06 \mu\text{m}$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere). Damit unterscheiden sich die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse sowohl signifikant von den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$, $N = 73$) als auch von den unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäusen ($p < 0,001$, $N = 73$) (s. Abb. 26, 32, 33).

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse ein kaum von der Wildtyp-Maus abweichenden Bild. (s. Abb. 27)

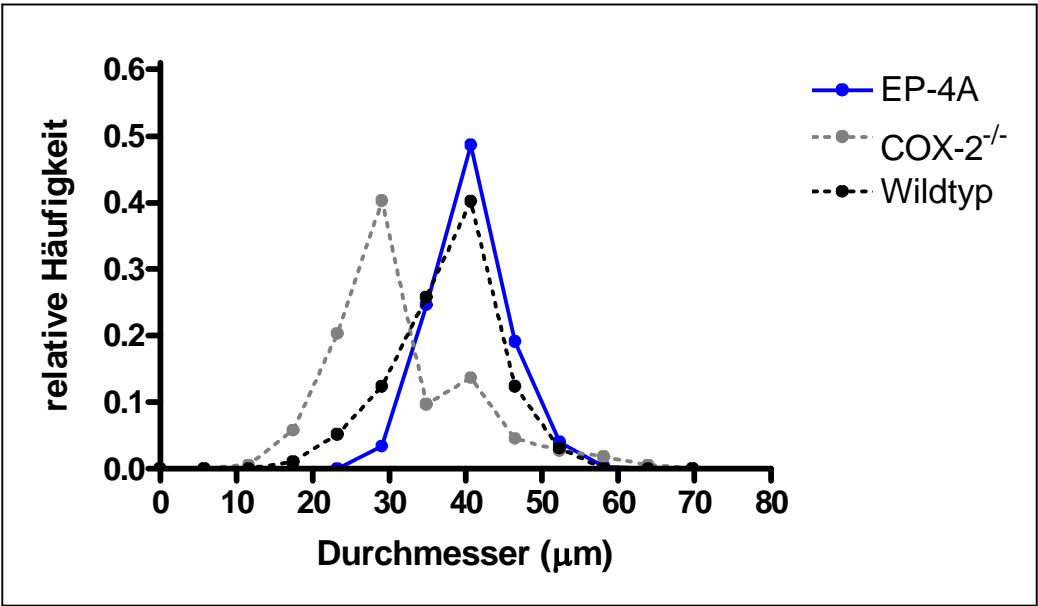


Abb. 27; Relative Häufigkeit der Glomerulardurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 160 ng/g KG ONO-AE1-329, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.3.2.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

Agonist	EP-4A ONO-AE1-329 (40 ng/g KG)	EP-4A ONO-AE1-329 (160 ng/g KG)
Glomerulumvolumen (µm³)	24570 ± 440	29680 ± 637
Kapseldistanz (µm)	35,44 ± 0,77	34,67 ± 1,06
% Glomeruli innerhalb 58µm	31 %	23 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	12,1 ± 0,16	12,2 ± 0,8

III.3.3. Applikation von EP-2- plus EP-4-Rezeptor-Agonisten

Um zu überprüfen, ob sich die Agonisten des EP-2- und EP-4-Rezeptors in ihrer Wirkung additiv verhalten, wurden sowohl ONO-AE1-259-01 als EP-2-Agonist als auch ONO-AE1-329 als EP-4-Agonist zusammen appliziert. Die eingesetzten Dosierungen beliefen sich auf 640 ng/g KG bzw. 3,2 µg/µl für den EP-2-Agonisten und 160 ng/g KG bzw. 800 ng/µl für den EP-4-Agonisten.

Es ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $12 \cdot 10^{-3} \pm 0,26 \cdot 10^{-3}$.

Die histomorphologische Untersuchung der Nieren zeigte Glomeruli mit einem Volumen von: $28750 \pm 1172 \mu\text{m}^3$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere). Damit ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren ($p = 0,354$, $N = 289$) (s. Abb. 28, 32, 33).

Analysiert man die Nieren auf die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel ergeben sich folgende Werte: $24,44 \pm 1,66 \mu\text{m}$ (behandelte COX-2^{-/-}-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (unbehandelte COX-2^{-/-}-Tiere). Dies stellt jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren dar ($p = 0,001$, $N = 98$) (s. Abb. 28, 32, 33).

Trägt man diese Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Tiere ein fast mit dem Wildtyp-Tier identisches Bild. (s. Abb.29)

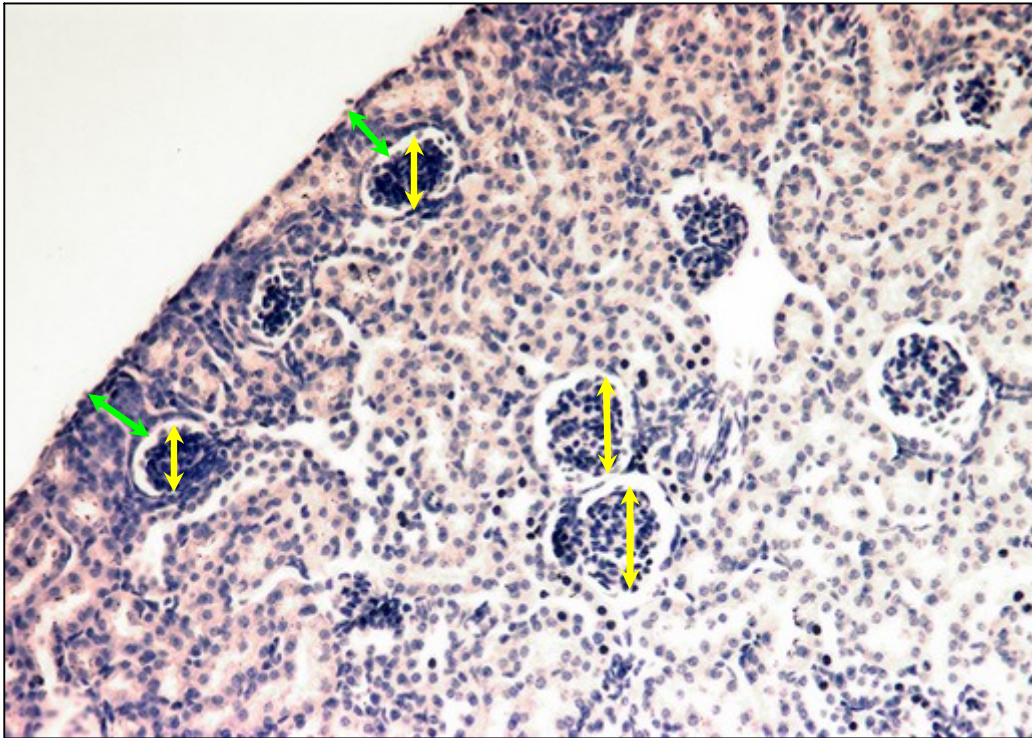


Abb. 28; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 640 ng/g KG ONO-AE1-259-01 und 160 ng/g KG ONO-AE1-329, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt gut entwickelte Glomeruli, aber mit zu geringem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

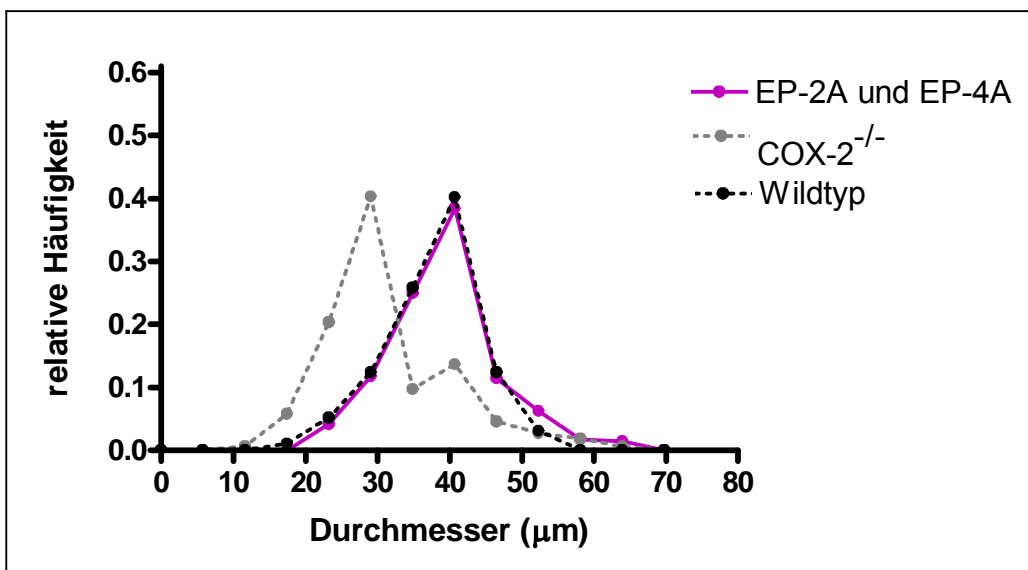


Abb. 29; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 640 ng/g KG ONO-AE1-259-01 und 160 ng/g KG ONO-AE1-329, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.3.3.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

Agonist	EP-2A ONO-AE1-259-01 u. EP-4A ONO-AE1-329 (640 ng/g KG) (160 ng/g KG)
Glomerulumvolumen (μm^3)	28750 ± 1172
Kapseldistanz (μm)	$24,44 \pm 1,66$
% Glomeruli innerhalb $58\mu\text{m}$	34 %
Ratio (Niere : Körper) ($\bullet 10^{-3}$)	$12 \pm 0,26$

III.3.4. Applikation eines EP-4-Rezeptor-Antagonisten

Mit Hilfe des EP-4-Antagonisten ONO-AE3-208 und EP-2^{-/-}-Mäusen sollte noch einmal die essentielle Funktion der beiden PGE₂-Rezeptoren, EP-2 und EP-4, für die Nephrogenese nachgewiesen werden, indem man zeigt, dass durch selektives Ausschalten der EP-2- und der EP-4-Rezeptoren das Bild der COX-2^{-/-}-Maus erzeugt werden kann.

In einer Konzentration von 400 ng/g KG ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $11,21 \bullet 10^{-3} \pm 0,4 \bullet 10^{-3}$.

Histomorphologische Auswertungen der Nieren ergaben in diesem Versuchsansatz Glomeruli mit einem Volumen von: $20270 \pm 761 \mu\text{m}^3$ (behandelte EP-2^{-/-}-Tiere), $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ (Wildtyp-Tiere) und $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Damit unterscheiden sich die EP-2^{-/-}-Tiere sowohl signifikant von den Wildtyp-Tieren ($p < 0,001$, $N = 504$) als auch signifikant von den COX-2^{-/-}-Tieren ($p < 0,001$, $N = 504$) (s. Abb. 30, 32, 33).

Die Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel beliefen sich nach histomorphologischer Untersuchung auf Werte von: $41,07 \pm 1,07 \mu\text{m}$ (behandelte EP-2^{-/-}-Tiere), $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ (Wildtyp-Tiere) und $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ (COX-2^{-/-}-Tiere). Auch hierin unterscheidet sich das EP-2^{-/-}-Tier sowohl signifikant vom Wildtyp-Tier ($p = 0,047$, $N = 124$) als auch signifikant vom COX-2^{-/-}-Tier ($p < 0,001$, $N = 124$) (s. Abb. 30, 32, 33).

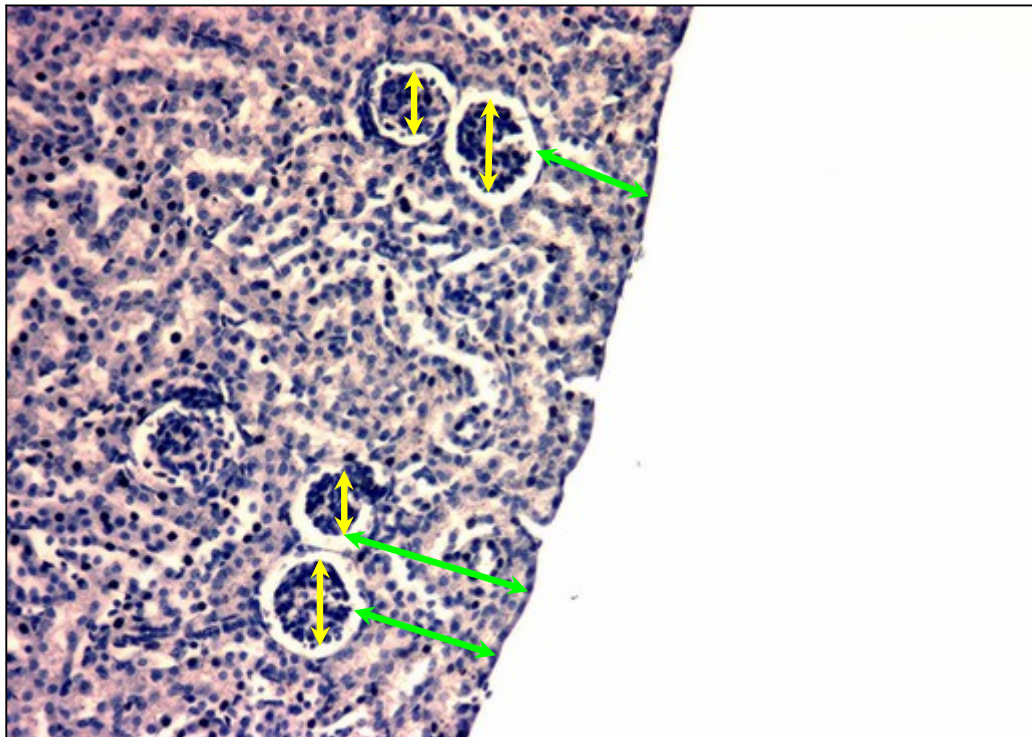


Abb. 30; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer EP-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 400 ng/g KG ONO-AE3-208, in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind mäßig entwickelte Glomeruli, mit mäßigem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapsel-distanz

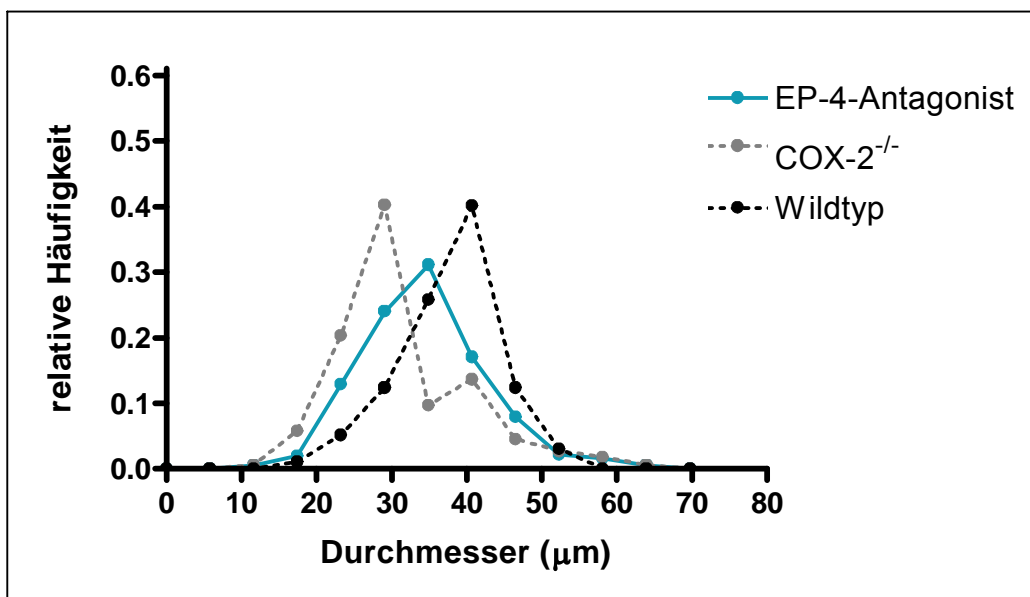


Abb. 31; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 400 ng/g KG ONO-AE3-208, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

Auftragen der erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse zeigt für die behandelten EP-2^{-/-}-Tiere ein sowohl von den COX-2^{-/-}-Tieren als auch von den Wildtyp-Tieren abweichendes Bild. (s. Abb. 31)

III.3.4.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

EP-4-Antagonist	ONO-AE3-208 (400 ng/g KG)
Glomerulumvolumen (μm^3)	20270 ± 761
Kapseldistanz (μm)	$41,07 \pm 1,07$
% Glomeruli innerhalb 58 μm	25 %
Ratio (Niere : Körper) ($\bullet 10^{-3}$)	$11,21 \pm 0,4$

III.3.5. Vergleichende Zusammenstellung

Im Folgenden sind jeweils alle Glomerulumvolumina und Kapseldistanzen der Glomeruli in einem Balkendiagramm dargestellt.

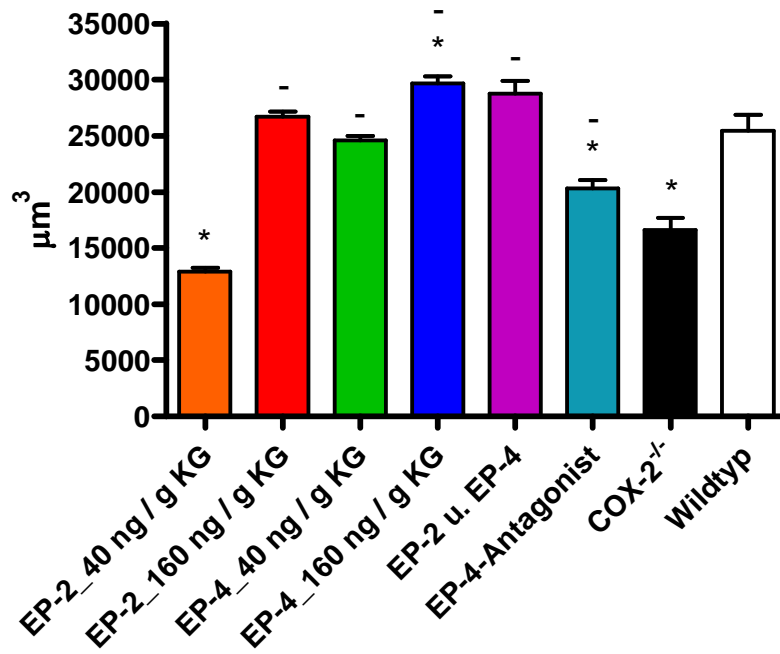


Abb. 32; Balkendiagramm der Glomerulumvolumina, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

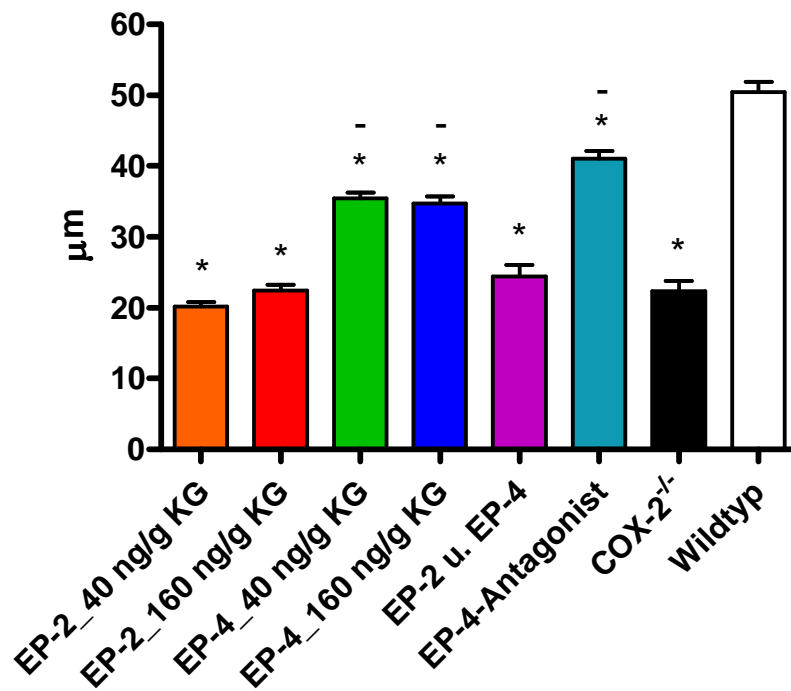


Abb. 33; Balkendiagramm der Kapseldistanzen, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

III.4. NO-Substanzen

Da Prostaglandin E₂ auch eine gefäßdilatierende und durchblutungssteigernde Wirkung hat, sollte die Hypothese, dass dies zur normalen Nierenentwicklung beiträgt, durch NO freisetzende Substanzen untersucht werden. Diese spalten ihre NO-Gruppe in wässrigem Milieu ab und können hierdurch eine gefäßdilatierende Wirkung auslösen. Es wurden zwei verschiedene Präparate verwendet: Spermine NONOate (NOC-22) und NOC-12. Diese unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit in wässrigem Milieu: 230 min (Spermine NONOate) und 327 min (NOC-12).

III.4.1. Applikation von Spermine NONOate (NOC-22)

Zunächst wurden die Effekte der NO-Substanz Spermine NONOate (NOC-22) in zwei verschiedenen Konzentrationen, 250 µg/ml und 1000 µg/ml, auf die Entwicklung der Niere untersucht.

In einer Konzentration von **250 µg/ml bzw. 1 µl/g KG** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $8,97 \cdot 10^{-3} \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$.

Bei der histomorphologischen Untersuchung der Nieren auf ihre Glomerulumvolumina zeigte sich bei den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $17690 \pm 1158 \mu\text{m}^3$ ein signifikant geringeres Volumen gegenüber den Wildtyp-Tieren mit $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 301$). Jedoch gibt es zu den unbehandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,105$, $N = 301$) (s. Abb. 35, 44, 45).

Auch in Bezug auf die Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel unterscheiden sich die behandelten COX-2^{-/-}-Tiere mit $19,17 \pm 1,33 \mu\text{m}$ signifikant vom Wildtyp-Tier mit $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $N = 178$). Jedoch gibt es zu den unbehandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,075$, $N = 178$) (s. Abb. 35, 44, 45).

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behan-

delten COX-2^{-/-}-Tiere ein fast mit dem unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier identisches Bild (s. Abb. 36).

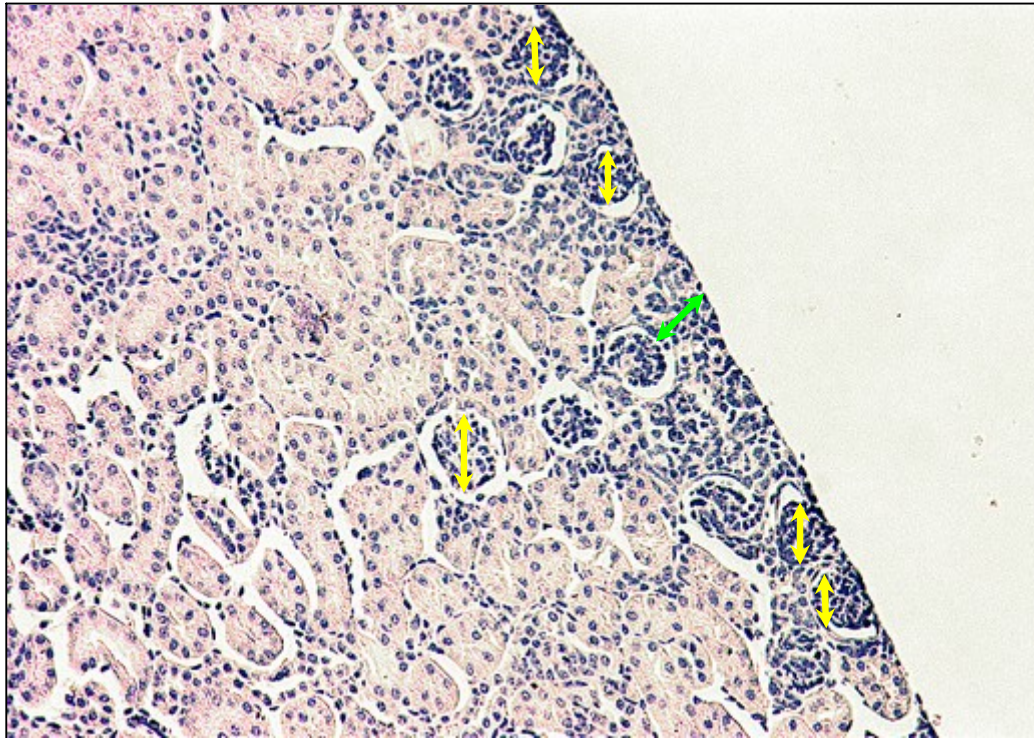


Abb. 35; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 250 µg/ml Spermine NONOate, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt deutlich verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

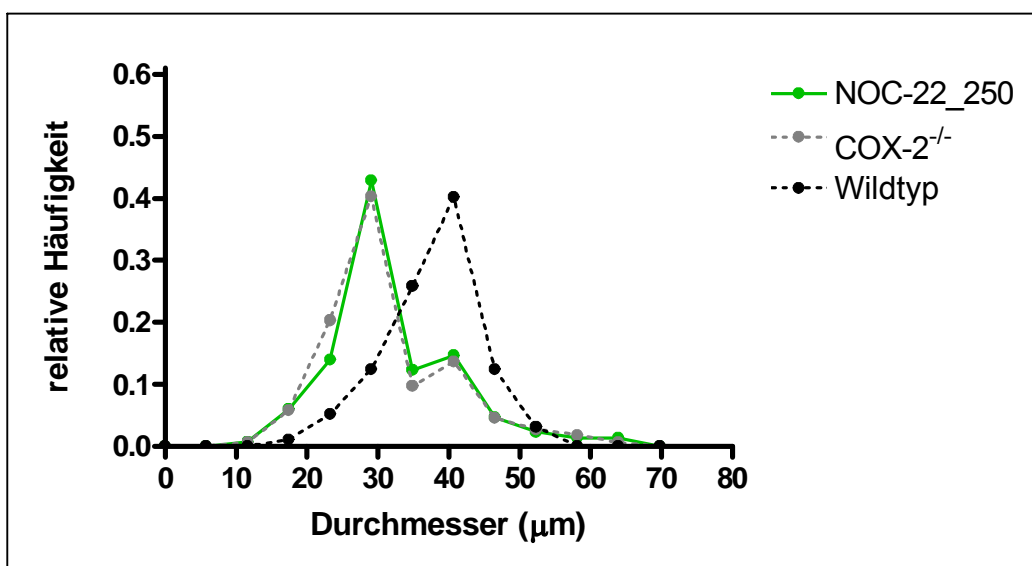


Abb. 36; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 250 µg/ml Spermine NONOate, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

In einer Konzentration von **1000 µg/ml bzw. 1 µl/g KG** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $9,52 \cdot 10^{-3} \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$.

Die histomorphologische Analyse der Nieren zeigte für die Glomeruli der behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $15440 \pm 529 \mu\text{m}^3$ ein signifikant geringeres Volumen als für die Wildtyp-Mäuse mit $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 214$), sowie ein signifikant geringeres Volumen als für die unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 214$) (s. Abb. 37, 44, 45).

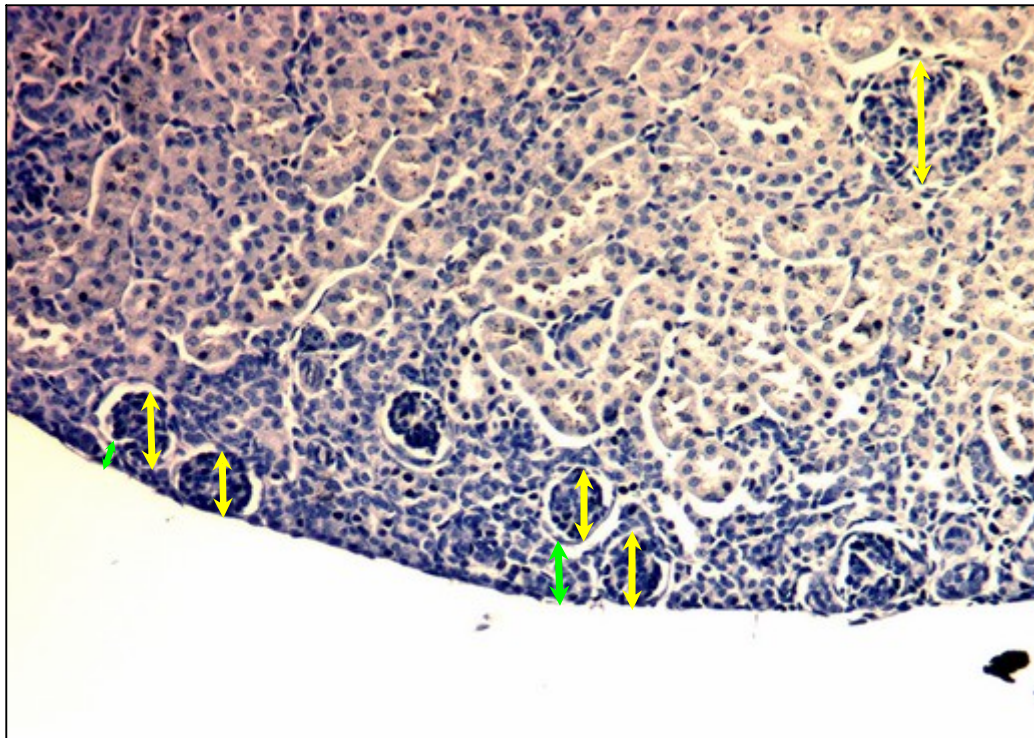


Abb. 37; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 1000 µg/ml Spermine NONOate, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt deutlich verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Inneren ein großes Glomerulum; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

Bei der histomorphologischen Auswertung der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel findet sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $18,78 \pm 1,16 \mu\text{m}$ ein signifikanter Unterschied gegenüber der Wildtyp-Maus mit $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $N = 115$) (s. Abb. 37, 44, 45).

Auftragen dieser Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse zeigt für die behandelten COX-2^{-/-}-Tiere ein gering vom unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier abweichendes Bild. Jedoch verschwindet die charakteristische „Schulter“ bei 40,71 µm (s. Abb. 38).

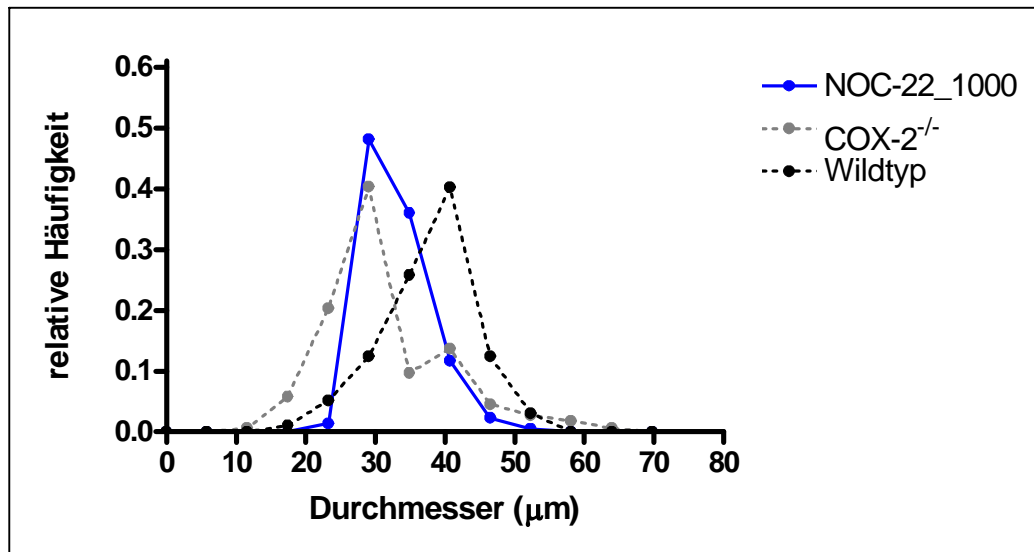


Abb. 38; Relative Häufigkeit der Glomerulardurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 1000 µg/ml Spermine NONOate, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.4.1.1. Applikation von NOC-22 ab Tag E6

In einem weiteren Versuchsansatz wurde versucht, die NO-Substanz Spermine NONOate (NOC-22) den Jungtieren bzw. Feten schon im Mutterleib über die Tränke und der Aufnahme der Mutter zu verabreichen. Dies geschah ab dem Tag E6. Die Konzentration lag bei diesem Versuch bei 1000 µg/ml bzw. 500 ng/g KG.

Nach Entnahme der Nieren am Tag P22 ergab sich eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $8,22 \cdot 10^{-3} \pm 0,59 \cdot 10^{-3}$.

Bei der histomorphologischen Untersuchung der Nieren auf ihre Glomerulumvolumina zeigte sich bei den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $18910 \pm 1590 \mu\text{m}^3$ ein signifikant kleineres Volumen als bei den Wildtyp-Tieren mit $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ ($p <$

0,001, N = 201). Zu den unbehandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,089$, N = 201) (s. Abb. 39, 44, 45). Die histomorphologische Analyse der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel ergab für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $17,13 \pm 1,61 \mu\text{m}$ einen signifikanten Unterschied, sowohl gegenüber der Wildtyp-Maus mit $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, N = 126) als auch gegenüber der unbehandelten COX-2^{-/-}-Maus mit $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ ($p = 0,007$, N = 126) (s. Abb. 39, 44, 45).

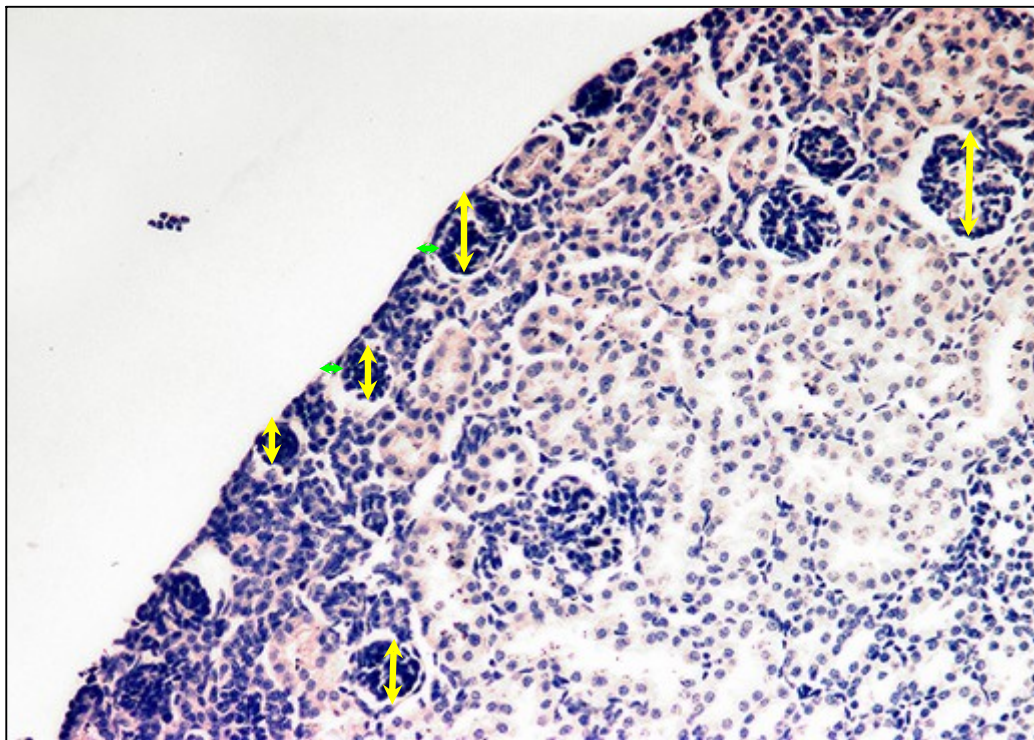


Abb. 39; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 1000 µg/ml Spermine NONOate ab E6, in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

Nach dem Auftragen der erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse zeigt sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Tiere ein fast mit dem unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier identisches Bild. Jedoch ist die charakteristische „Schulter“ bei 40,71 µm nicht mehr zu beobachten (s. Abb. 40).

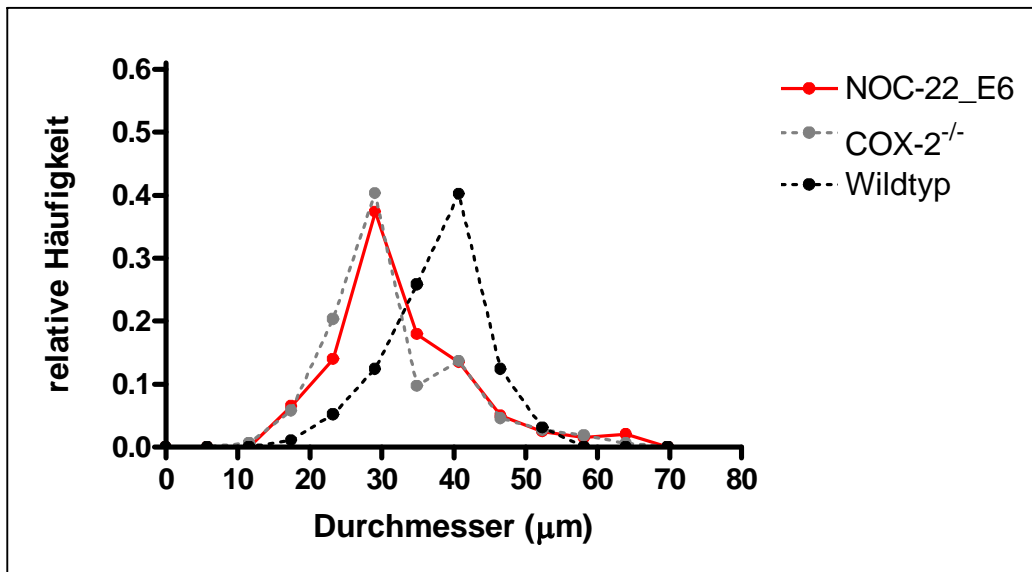


Abb. 40; Relative Häufigkeit der Glomerulardurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 1000 µg/ml Spermine NONOate ab Tag E6, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.4.1.2. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

NO-Substanz	Spermine NONOate (250 µg/ml)	Spermine NONOate (1000 µg/ml)	Spermine NONOate (1000 µg/ml) ab E6
Glomerulumvolumen (µm ³)	17690 ± 1158	15440 ± 529	18910 ± 1590
Kapseldistanz (µm)	19,17 ± 1,33	18,78 ± 1,16	17,13 ± 1,61
% Glomeruli innerhalb 58µm	59 %	54 %	63 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	8,97 ± 0,25	9,52 ± 0,16	8,22 ± 0,59

III.4.2. Applikation von NOC-12

Spermine NONOate zeigte keine protektive Wirkung bezüglich der Glomerulumvolumina bzw. der Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel. Daher wurde ein zweites Präparat aus Gruppe der NO-Substanzen erprobt, das NOC-12. Dies besitzt mit $t_{1/2} = 327$ min eine längere Halbwertszeit in wässrigem Milieu als Spermine NONOate mit $t_{1/2} = 230$ min.

Dieser Versuch wurde mit einer Konzentration von 200 µg/ml bzw. 1 µl/g KG durchgeführt.

Nach Entnahme der Nieren am Tag P22 ergab sich eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $10,01 \cdot 10^{-3} \pm 0,39 \cdot 10^{-3}$.

Die histomorphologische Auswertung der Nieren ergab bei den behandelten COX-2^{-/-}-Mäusen mit $19750 \pm 599 \mu\text{m}^3$ ein signifikant geringeres Glomerulumvolumen als bei den Wildtyp-Mäusen mit $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 318$). Zudem gibt es aber auch zu den unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäusen mit $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ eine signifikante Differenz ($p < 0,001$, $N = 318$) (s. Abb. 41, 44, 45).

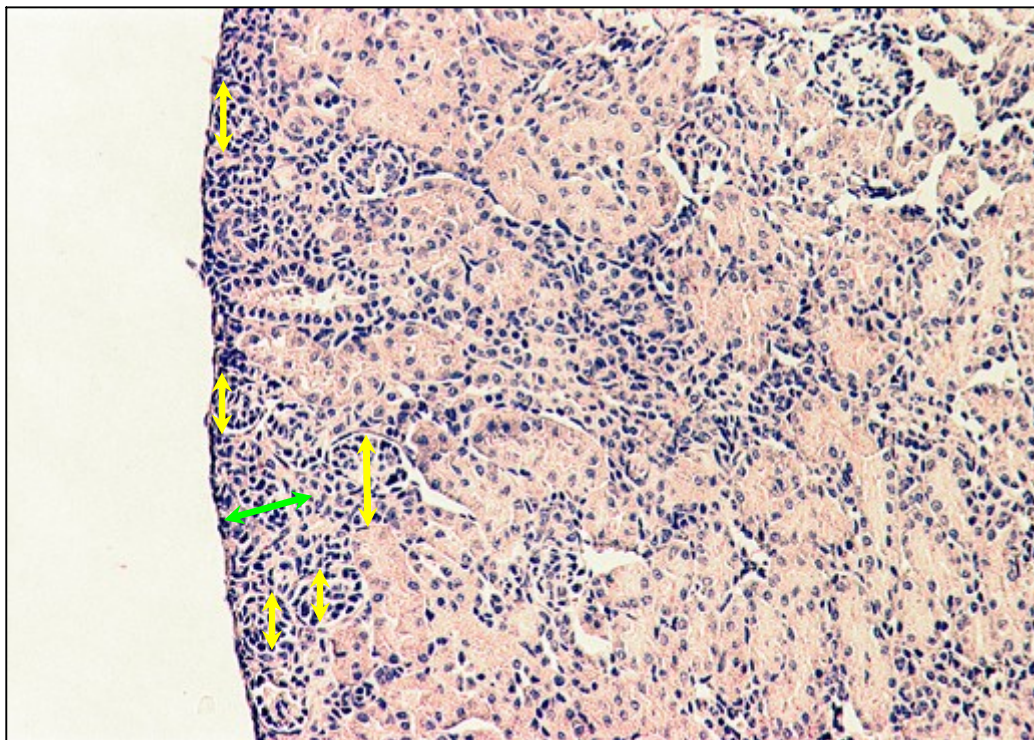


Abb. 41; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 200 µg/ml NOC-12, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↑ Kapseldistanz

Bei den Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel weisen die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $16,49 \pm 0,94 \mu\text{m}$ eine signifikant geringere Distanz, zum einen als die Wildtyp-Mäuse mit $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $N = 155$), und zum anderen als die unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ ($p = 0,006$, $N = 155$), auf (s. Abb. 41, 44, 45).

Trägt man die erhobenen Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse ein sowohl vom unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier als auch vom Wildtyp-Tier abweichendes Bild (s. Abb. 42).

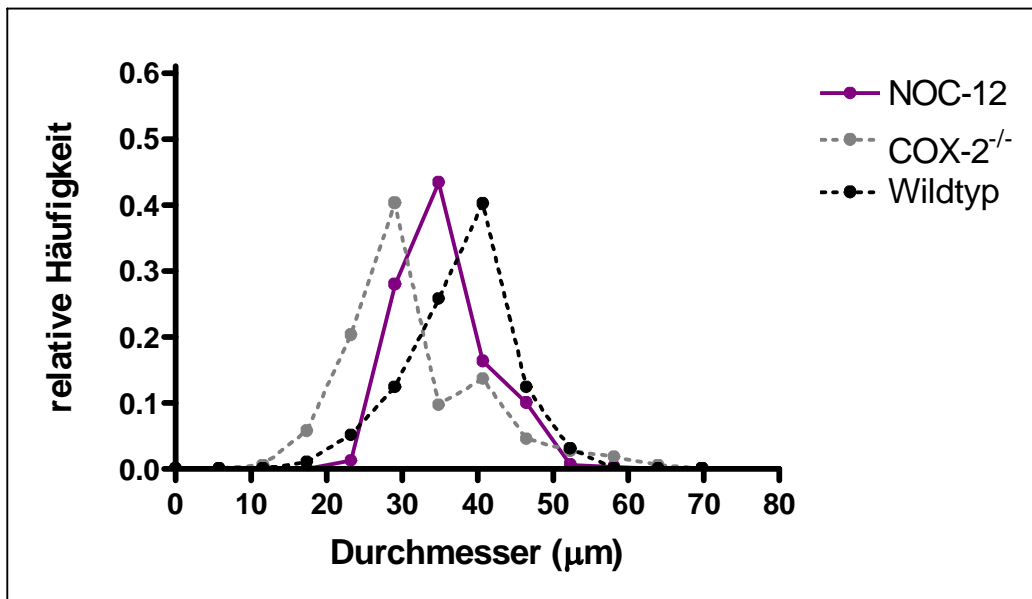


Abb. 42; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 200 µg/ml NOC-12, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.4.2.1. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

NO-Substanz	NOC-12 (200 µg/ml)
Glomerulumvolumen (µm ³)	19750 ± 599
Kapseldistanz (µm)	16,49 ± 0,94
% Glomeruli innerhalb 58µm	49 %
Ratio (Niere : Körper) (• 10 ⁻³)	10,01 ± 0,39

III.4.3. Vergleichende Zusammenstellung

Im Folgenden sind jeweils alle Glomerulumvolumina und Kapseldistanzen der Glomeruli in einem Balkendiagramm dargestellt.

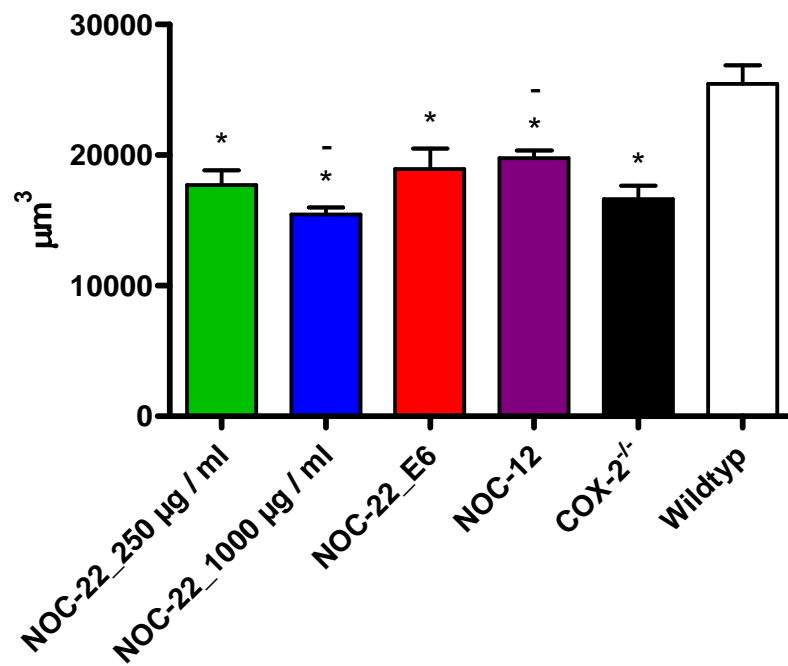


Abb. 44; Balkendiagramm der Glomerulumvolumina, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

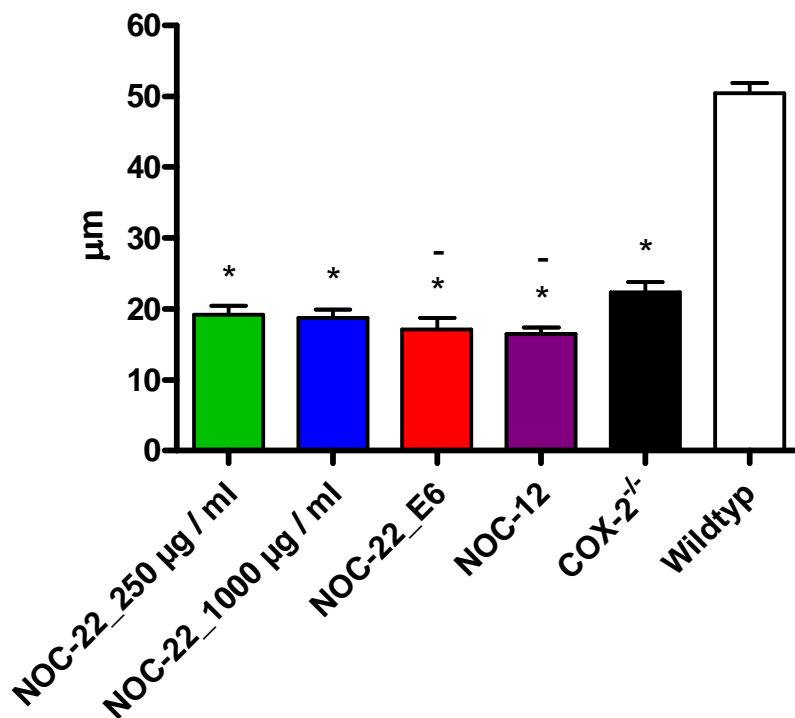


Abb. 45; Balkendiagramm der Kapseldistanzen, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

III.5. PPAR-Agonisten

III.5.1. Applikation des PPAR γ -Agonisten Troglitazone

In einer Konzentration von **200 ng/g KG Troglitazone** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $9,28 \cdot 10^{-3} \pm 0,37 \cdot 10^{-3}$.

Die Analyse der Histomorphologie der Nieren in diesem Versuchsansatz ergab für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse mit $10930 \pm 375 \mu\text{m}^3$ ein signifikant kleineres Glomerulumvolumen, sowohl gegenüber den Wildtyp-Mäusen mit $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 337$) als auch gegenüber den unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäusen mit $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ ($p = 0,005$, $N = 337$) (s. Abb. 46, 50, 51).

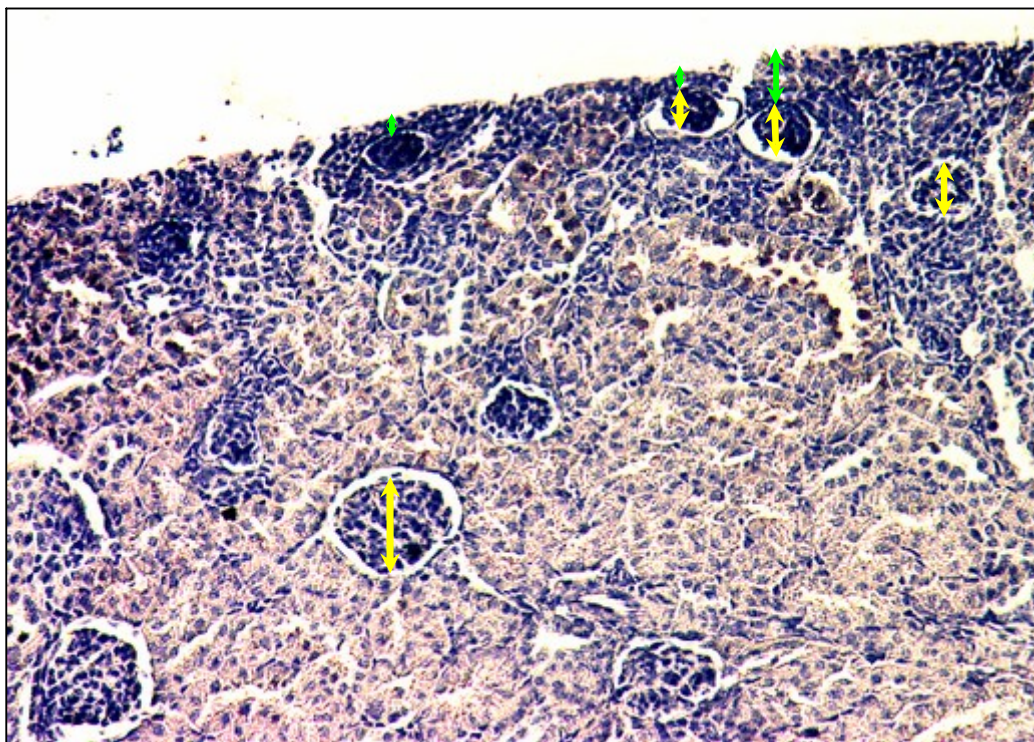


Abb. 46; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 200 ng/g KG Troglitazone, in H.E.-Färbung am Tag P22. Zu sehen sind deutlich verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Inneren ein gut entwickeltes Glomerulum; \updownarrow Glomerulumdurchmesser, \updownarrow Kapseldistanz

Für die Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel findet sich bei den behandelten COX-2^{-/-}-Mäusen mit $16,65 \pm 0,83 \mu\text{m}$ eine signifikant geringere Dis-

tanz, sowohl gegenüber den Wildtyp-Mäusen mit $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $N = 181$) als auch gegenüber den unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäusen mit $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ ($p = 0,007$, $N = 181$) (s. Abb. 46, 50, 51).

Das Auftragen dieser Daten in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse zeigt für die behandelten COX-2^{-/-}-Mäuse ein fast mit den unbehandelten COX-2^{-/-}-Mäusen identisches Bild. Jedoch verschwindet die charakteristische „Schulter“ bei $40,71 \mu\text{m}$ (s. Abb. 47).

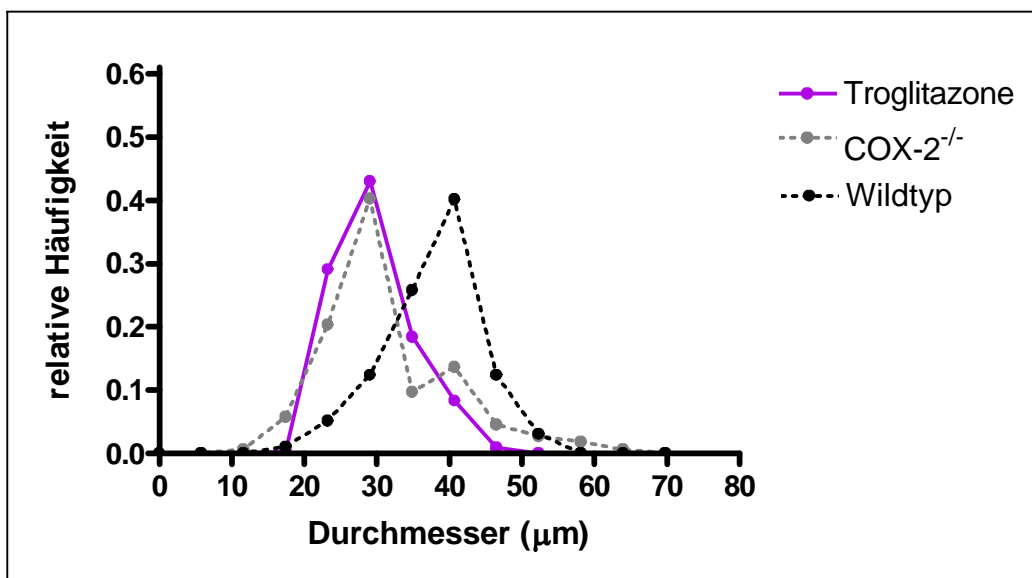


Abb. 47; Relative Häufigkeit der Glomerulumdurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 200 ng/g KG Troglitazone, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.5.2. Applikation des PPAR α -Agonisten GW501516

In einer Konzentration von **200 ng/g KG GW501516** ergab sich nach Entnahme der Nieren am Tag P22 eine Ratio des Gesamtnierengewichts zum Körpergewicht von durchschnittlich $10,95 \cdot 10^{-3} \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$.

Die Auswertung der histomorphologischen Daten der Nieren zeigte bei den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $7951 \pm 292 \mu\text{m}^3$ ein signifikant kleineres Glomerulumvolumen, sowohl gegenüber den Wildtyp-Tieren mit $25440 \pm 1422 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 275$) als auch gegenüber den unbehandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $16600 \pm 1045 \mu\text{m}^3$ ($p < 0,001$, $N = 275$) (s. Abb. 48, 50, 51).

Untersuchungen zu den Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel ergaben bei den behandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $23,81 \pm 0,89 \mu\text{m}$ eine signifikant geringere Distanz als bei den Wildtyp-Tieren mit $50,42 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $N = 135$). Jedoch gibt es zu den unbehandelten COX-2^{-/-}-Tieren mit $22,39 \pm 1,38 \mu\text{m}$ keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,198$, $N = 135$) (s. Abb. 48, 50, 51).

Trägt man die erhobenen Werte in einen Graphen mit dem Durchmesser auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse auf, so zeigt sich für die behandelten COX-2^{-/-}-Tiere ein in der Form der COX-2^{-/-}-Maus fast identisches, jedoch nach links verschobenes Bild (s. Abb. 49).

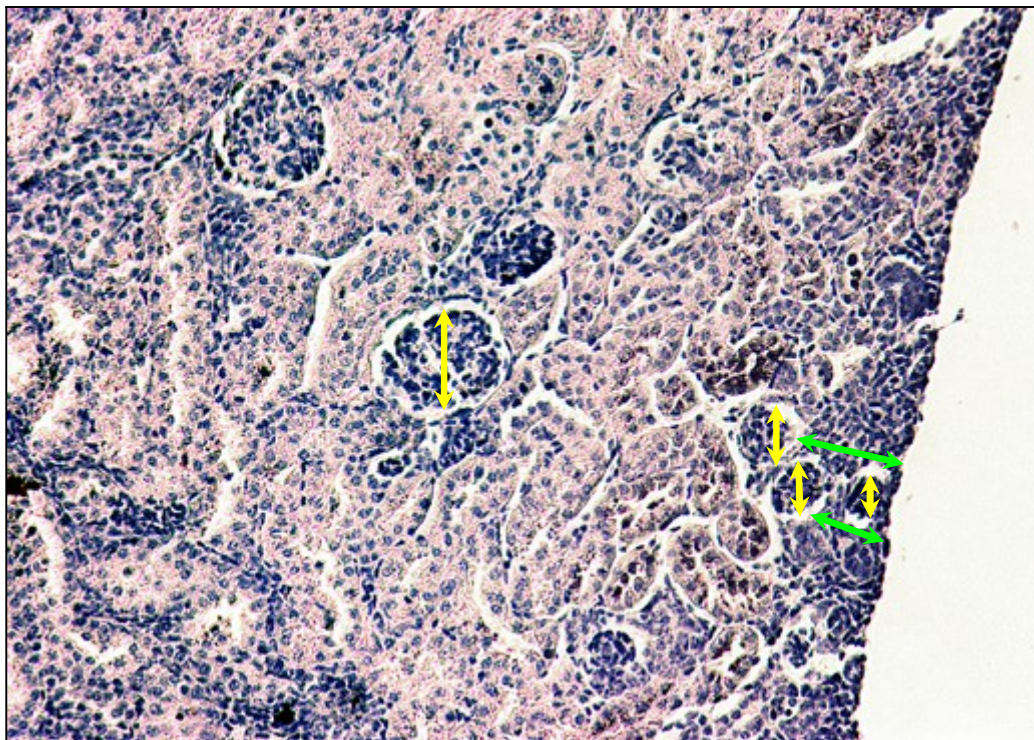


Abb. 48; Ausschnitt der 200x vergrößerten Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, behandelt mit 200 ng/g KG GW501516, in H.E.-Färbung am Tag P22. Die Abb. zeigt deutlich verkleinerte Glomeruli, teils subkapsulär gelegen mit zu geringem Kapselabstand. Im Inneren ein gut entwickeltes Glomerulum; ↓ Glomerulumdurchmesser, ↓ Kapseldistanz

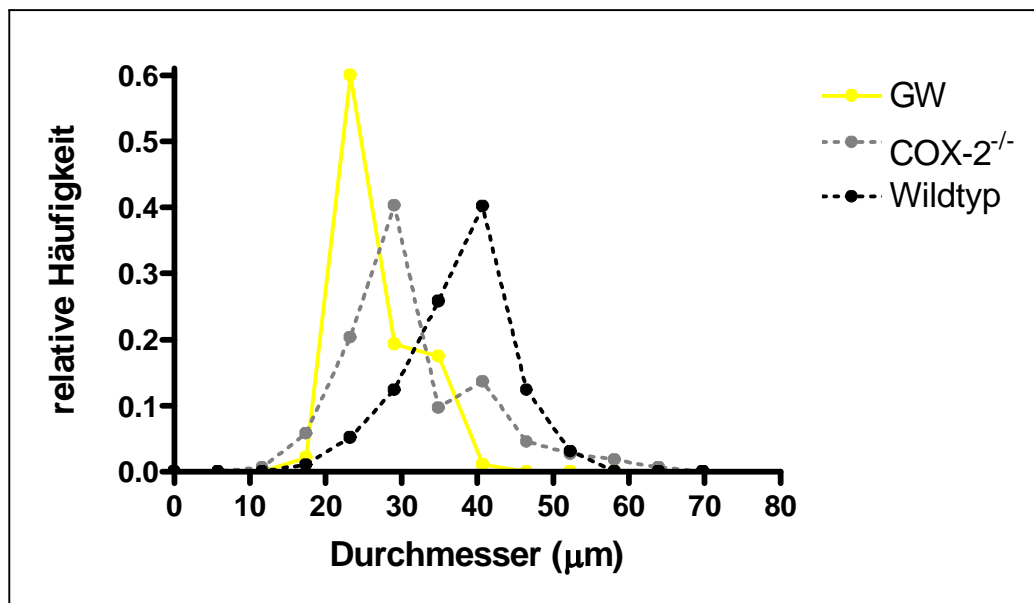


Abb. 49; Relative Häufigkeit der Glomerulardurchmesser der Niere einer WT-Maus, behandelt mit 200 ng/g KG GW501516, im Vergleich zu WT-Kontrolle und COX-2^{-/-}

III.5.3. Zusammenfassung der histomorphologischen Daten

Agonist	PPAR γ -Agonist Troglitazone (200 ng/g KG)	PPAR δ -Agonist GW501516 (200 ng/g KG)
Glomerulumvolumen (μm^3)	10930 \pm 375	7951 \pm 292
Kapseldistanz (μm)	16,65 \pm 0,83	23,81 \pm 0,89
% Glomeruli innerhalb 58 μm	54 %	49 %
Ratio (Niere : Körper) ($\cdot 10^{-3}$)	9,28 \pm 0,37	10,95 \pm 0,18

III.5.4. Vergleichende Zusammenstellung

Im Folgenden sind jeweils alle Glomerulumvolumina und Kapseldistanzen der Glomeruli in einem Balkendiagramm dargestellt.

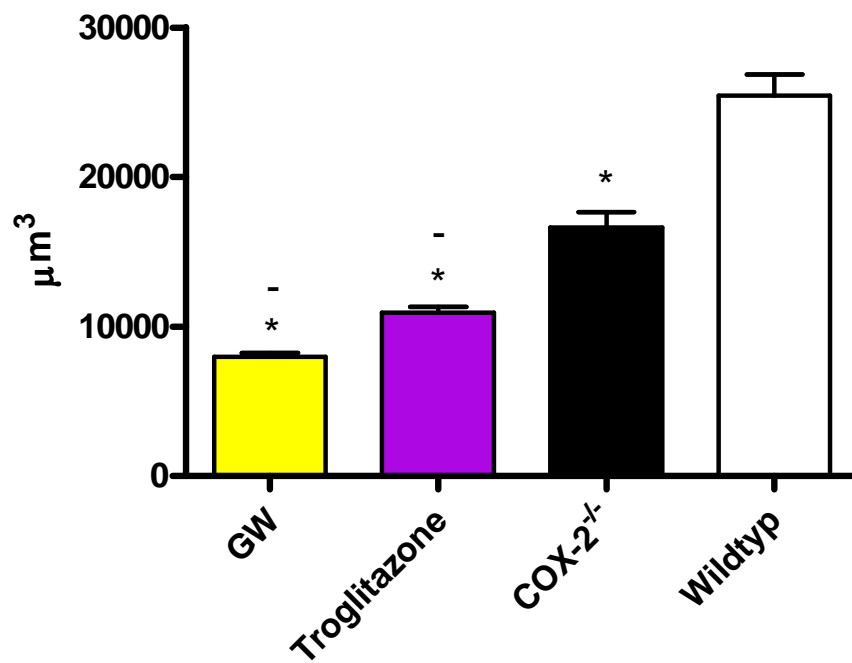


Abb. 50; Balkendiagramm der Glomerulumvolumina, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

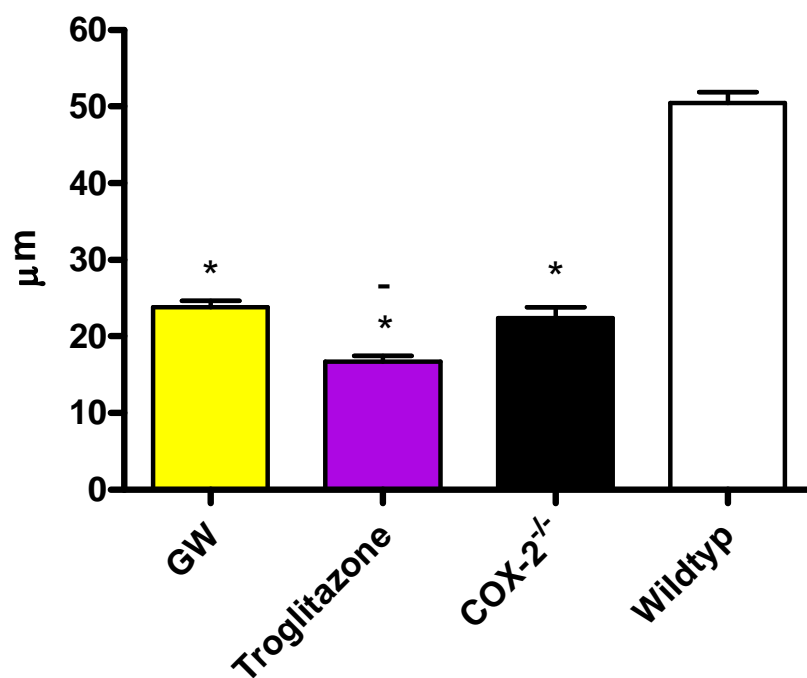


Abb. 51; Balkendiagramm der Kapseldistanzen, * $p < 0,05$ versus Wildtyp, - $p < 0,05$ versus COX-2^{-/-}

IV. Diskussion

Die Niere des erwachsenen Menschen, als auch der Maus, ist ein Organ mit hoher Prostaglandinsynthesekapazität. Dabei regulieren Prostaglandine verschiedene Aufgaben in der Niere. Dazu zählen der glomeruläre- und medulläre Blutfluss, die Reninsekretion und der Salz- und Wassertransport im dicken Teil der Henle-Schleife und in den Sammelrohren [Breyer und Badr, 1996]. Es hat sich zudem auch gezeigt, dass Prostaglandine sowohl in der fetalen Niere als auch in der Niere des Neugeborenen synthetisiert werden [Day et al., 1974]. Der gezielte Knockout des COX-2-Gens ergibt das Bild einer Abhängigkeit der Nephrogenese vom COX-2-Protein [Morham et al., 1995; Dinchuk et al., 1995; Norwood et al., 2000].

So zeigten Morham et al. [1995], dass die Nieren einer COX-2^{-/-}-Maus makroskopisch klein, blass und mit granulärer Erscheinung auf der Kapseloberfläche sind. Nach dem Wiegen der Nieren konnte eine reduzierte Ratio aus Gesamtnierengewicht und Körpergewicht von Norwood et al. [2000] beobachtet werden. Bei der histologischen Betrachtung der Nierenschnitte stellten sich die subkapsulär gelegenen Glomeruli als zusammengedrängt, klein und unterentwickelt in einem, im Vergleich zum Wildtyp, dünneren Kortex dar [Dinchuk et al., 1995; Morham et al., 1995; Norwood et al., 2000]. Glomeruli außerhalb dieser Zone wirkten vergrößert [Morham et al., 1995]. Zudem konnten kortikomedulläre Mikrozysten bzw. zystische Formationen nachgewiesen werden [Dinchuk et al., 1995; Norwood et al., 2000].

Diese, von Morham et al. [1995], Dinchuk et al. [1995] und Norwood et al. [2000] experimentell erhobenen deskriptiven Beschreibungen, konnten auch in dieser Studie beobachtet werden. So stellten sich die an P22 entnommenen COX-2^{-/-}-Nieren ebenfalls als klein und blass dar. Jedoch die granuläre Erscheinung auf der Kapseloberfläche konnte nicht beobachtet werden. Nach dem Wiegen der Mäuse und der Nieren zeigte sich wie bei Norwood et al. [1995] eine deutlich reduzierte Ratio aus Gesamtnierengewicht zum Körpergewicht. Im histologischen Schnitt ergab sich wie beschrieben das Bild einer unterentwickelten Niere mit kleinen zusammengedrängten, subkapsulär gelegenen Glomeruli, in einem dünnen Kortex mit zystischen Formationen.

Der genaue Mechanismus, für den das COX-2^{-/-}-Protein benötigt wird, um die gezeigten Veränderungen abzuwenden, blieb bislang allerdings unklar.

IV.1. Einfluss von COX-2-Inhibitoren auf die Nephrogenese

Zunächst war es von Interesse, verschiedene, in der Klinik eingesetzte selektive COX-2-Hemmer, auf ihre schädigenden Effekte während der Nephrogenese zu untersuchen.

Kömhoff et al. [2000] konnten bereits die negativen Einflüsse von SC-236, eines dem Celecoxib verwandten selektiven COX-2-Hemmers, beobachten. So zeigten sie neben einem deutlich reduzierten kortikalen Volumen am Tag P21, auch ebenfalls deutlich reduzierte Glomerulumdurchmesser. Nach Gabe des SC-236 vom Tag E0,5 bis zum Tag P21, in einer Konzentration von 0,6 µg/ml, reduzierte sich dort der Glomerulumdurchmesser auf 61 % des Durchmessers eines Kontrolltiers. Wurde SC-236 erst ab dem Tag P1 appliziert, so waren die beobachteten Effekte weniger stark ausgeprägt. Hier betrug der Glomerulumdurchmesser nur 79 % des Durchmessers gegenüber einem Kontrolltier. Für diesen Effekt machten sie einen diaplazentaren Medikamententransfer verantwortlich. Bei einem COX-2^{-/-}-Tier stellten Kömhoff et al. [2000] einen auf 62 % reduzierten Glomerulumdurchmesser fest.

In dieser Studie wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den zuvor gemachten Experimenten zu haben, auf eine Gabe des SC-236 ab dem Tag E0,5 verzichtet. So erfolgte die Gabe nur von Tag P1 bis Tag P21.

Neben einem dosisabhängigen Effekt sowohl der Glomerulumvolumina als auch der Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel zeigte sich auch ein Unterschied der Ergebnisse nach der Applikationsart. Wurde das SC-236 den Mäusenachkommen intraperitoneal (i.p.) injiziert, so verringerte sich das Glomerulumvolumen auf 76 %. Durch Zufügen der Substanz der Wassertränke reduzierte sich das Glomerulumvolumen bei einer Konzentration von 12 µg/ml nur auf 88 %, wohingegen es sich bei einer Konzentration von 30 µg/ml auf 69 % gegenüber einer Wildtyp-Maus verringerte. Eine COX-2^{-/-}-Maus wies im Mittel eine Reduktion der Glomerulumvolumina auf 65 % der Durchmesser der Wildtyp-Mäuse auf.

Die Betrachtung der Ergebnisse in absoluten Zahlen ergibt keinen signifikanten Unterschied in der Behandlung mit 30 µg/ml SC-236, mit Parecoxib oder mit Rofecoxib, sodass davonzugehen ist, dass die beobachteten Effekte der applizierten Coxibe auf der COX-2-Hemmung beruhen und nicht unspezifische Wirkungen darstellen.

Die Ergebnisse der Glomerulumdistanzen von der Nierenkapsel ergeben ein differenzierteres Bild. Hier ist schon in einer Konzentration von 12 µg/ml des SC-236 kein signifikanter Unterschied zum COX-2^{-/-}-Tier auszumachen, während es in der Konzentration von 30 µg/ml darüber hinaus schädigend wirkt. Die intraperitoneale Gabe liefert indifferente Ergebnisse. Die Effekte von Parecoxib und Rofecoxib sind, was die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel betrifft, weniger stark ausgeprägt, verglichen mit den Effekten auf die Glomerulumvolumina. Bei Rofecoxib sind diese am stärksten ausgeprägt.

Damit konnte gezeigt werden, dass auch in der Zeit von P1 bis P21 pharmakologisch mit SC-236 das Bild einer COX-2^{-/-}-Niere erzeugt werden kann. Jedoch bei deutlich höheren Konzentrationen als von Kömhoff et al. [2000] beschrieben. Zumindest in Bezug auf die Glomerulumvolumina gilt dies auch für Parecoxib und Rofecoxib.

Offen bleibt jedoch die Frage nach der Vergleichbarkeit der mit SC-236 erlangten Ergebnisse. Denn in der ersten Versuchsreihe wurde den Tieren die Substanz direkt intraperitoneal injiziert, wodurch die gesamte Konzentration im Organismus wirken konnte. In der zweiten Versuchsreihe wurde die Substanz dem Trinkwasser des Muttertiers zugegeben und gelangte erst über die Muttermilch in den Körper des Jungtiers. Es sind zwar die jeweils eingesetzten Konzentrationen im Trinkwasser und mit 1 ml/d die durchschnittliche Trinkmenge des Muttertiers bekannt, der entscheidende Aspekt ist jedoch, wieviel von der dem Trinkwasser zugesetzten Substanz auf das Jungtier übertragen wird. Dafür wären Informationen über das Ausmaß der Verstoffwechslung im Muttertier und den Grad des Übertritts in die Muttermilch, und somit der in ihr erreichten Konzentration, nötig. Die höchste Aussagekraft besäße jedoch eine Plasmabestimmung des Arzneimittels am Jungtier.

Die in der Arbeit von Kömhoff et al. [2000] beobachteten Nierenschäden unter der Behandlung mit SC-236, in einer Dosis von 0,6 µg/ml in der Wassertränke, konnten von mir nicht nachvollzogen werden. Unter meinen experimentellen Bedingungen ergaben sich erst ab einer Dosis von 12 µg/ml in der Wassertränke Effekte auf die Nierenentwicklung.

Eine Übertragung meiner Beobachtungen auf den Menschen bedeutet, dass Cyclooxygenase-2-Hemmer zumindest im 3. Trimenon absolut kontraindiziert sind, da sowohl die hohe Dosis von 30 µg/ml als auch die geringere Dosis von 12 µg/ml in der Wassertränke ausreicht, um signifikante Schäden während der Nephrogenese zu verursachen.

IV.2. Einfluss von EP-Agonisten auf die Nephrogenese

Da den Säugern durch den Wegfall der Cyclooxygenase-2 die darüber synthetisierten Prostaglandine fehlen, lag es als erstes Versuchsziel nahe, den COX-2^{-/-}-Mäusen entweder direkt PGE₂ oder Agonisten an deren Rezeptoren zu substituieren. Christian Breitbarth konnte in seiner Dissertation (beim Dekanat des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg eingereicht) zeigen, dass PGE₂ und klinisch genutzte PGE₂-Analoga keine bessere Wirkung bzw. nephroprotektiven Effekt aufweisen, vermutlich aufgrund einer zu kurzen Halbwertszeit. So wurde die Studie mit EP spezifischen Agonisten, die eine höhere Stabilität aufweisen, durchgeführt. Hier zeigte sich bei den Glomerulumvolumina ein von der Dosis abhängiger Effekt. Während nach Gabe von 40 ng/g KG des EP-2-Agonisten ONO-AE1-259-01 sogar geringere Glomerulumvolumina als bei einer unbehandelten COX-2^{-/-}-Maus gemessen wurden, waren die Nieren der behandelten COX-2^{-/-}-Tiere nach Applikation von 160 ng/g KG ONO-AE1-259-01 nicht von der einer Wildtyp-Maus zu unterscheiden. Auf die Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel hat ONO-AE1-259-01 sowohl in niedriger als auch in hoher Dosis keinen signifikanten Effekt. Es konnte in diesem Punkt keine signifikante Differenz zwischen behandelten und unbehandelten COX-2^{-/-}-Tieren beobachtet werden. Neben dem EP-2-Rezeptor signalisiert auch der EP-4-Rezeptoren einen intrazellulären cAMP-Anstieg. Daher wurden auch Untersuchungen an diesem Rezeptor durchgeführt. Bei dieser Versuchsreihe am EP-4-Rezeptor war ebenfalls ein dosisabhängiger Effekt zu beobachten. Im Unterschied zum EP-2-Rezeptor hat sich hier schon bei der geringen Konzentration von 40 ng/g KG des EP-4-Agonisten ONO-AE1-329 kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp-Niere, bezüglich der Glomerulumvolumina gezeigt. In der höheren Dosis von 160 ng/g KG wurden signifikant größere Glomerulumvolumina gemessen als beim Wildtyp-Tier.

Bei Betrachtung der Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel ergab sich ein von der Dosis unabhängiges Ergebnis. In beiden Dosierungen wichen die behandelten Nieren signifikant von der COX-2^{-/-}-Niere als auch von der Wildtyp-Niere ab. Das Ergebnis liegt genau in der Mitte zwischen beiden und ist somit als Partialeffekt anzusehen.

Bei Kombination beider Agonisten, ONO-AE1-259-01 und ONO-AE1-329, in hoher Konzentration konnte bei den Glomerulumvolumina ein minimal geringerer Effekt als unter alleiniger hoher EP-4-Agonistengabe beobachtet werden. Bezüglich der Entfernung der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel zeigt sich ein minimal höherer Effekt als unter alleiniger hoher EP-2-Agonistengabe.

Die gemachten Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass sowohl Agonisten am EP-2-Rezeptor als auch am EP-4-Rezeptor in der Lage sind, das Volumendefizit der Glomeruli der COX-2^{-/-}-Mäuse zu beheben, und dass sie damit wichtige und entscheidende Bausteine bzw. Faktoren während der Nephrogenese sind. Dabei erwies sich der EP-4-Agonist als die Substanz mit der größeren rekonstituierenden Wirkung. Dieser Unterschied war besonders bei einer Konzentration von 40 ng/g KG ausgeprägt.

Im Laufe der Nierenentwicklung kommt es zu einer zentripetalen Wanderung der Nephrone in Richtung Mark, sodass die juxtamedullär gelegenen Nephrone denen der zuerst synthetisierten entsprechen und die subkapsulär gelegenen die zuletzt entwickelten sind. Eine subkapsuläre Anhäufung der Glomeruli stellt eine Entwicklungsretardierung dar [Dinchuk et al., 1995; Morham et al., 1995; Norwood et al., 2000].

Mit Bezug darauf fallen die Ergebnisse der Kapseldistanzen der Glomeruli eher ernüchternd aus. Hier scheint nur der EP-4-Agonist eine Partialwirkung zu besitzen, während der EP-2-Agonist entweder gar keine, oder im Gemisch mit dem EP-4-Agonist, eine hemmende Wirkung entfaltet. Diese Erkenntnis legt nahe, dass für die richtige Entwicklung der Kapseldistanzen der Glomeruli entweder höhere Dosen, insbesondere des EP-4-Agonisten, von Nöten sind, oder ganz andere zusätzliche Mechanismen dafür verantwortlich sind. Als erstes sollten daher zukünftige Studien die Dosisfrage klären.

IV.3. Einfluss eines EP-4-Antagonisten auf die Nephrogenese

Mit dem Ziel die Bedeutung des EP-4-Rezeptors für die Nierenentwicklung noch weiter aufzuklären, wurde der EP-2^{-/-}-Maus ein EP-4-Antagonist appliziert. Da der EP-2-Knockout per se noch keine Nierenveränderungen liefert [Narumiya und Fitzgerald, 2001], war es interessant zu beobachten, welche Effekte auftreten, wenn zudem der EP-4-Rezeptor ausfällt und ob die Ergebnisse mit denen von selektiven COX-2-Hemmern identisch sind.

Dieser Versuch zeigte eindeutig, dass die EP-4-Blockade beim renohistologisch unauffälligen EP-2^{-/-}-Tier eine Störung der Nephrogenese vergleichend zu der bei COX-2^{-/-}-Tieren induziert. Allerdings waren die Effekte nicht so stark ausgeprägt. Jedoch unterstrich er die Bedeutung des EP-4-Rezeptors für die Nephrogenese. Weiter zeigt er, dass der Ausfall des EP-2-Rezeptors scheinbar durch den EP-4-Rezeptor kompensiert werden kann. Denn erst nach dessen Ausfall sind Veränderungen sichtbar.

Das korrespondierende Experiment mit einem EP-2-Antagonisten an einer EP-4^{-/-}-Maus war wegen mangelnder Verfügbarkeit des Antagonisten nicht durchführbar.

Interessant für weitere Studienmodelle wird herauszufinden sein, ob auch umgekehrt der selektive Ausfall des EP-4-Rezeptors vom EP-2-Rezeptor kompensiert werden kann, oder ob noch ganz andere Kompensationsmechanismen eine Rolle spielen.

Des Weiteren sollten zukünftige Arbeiten klären, welche zusätzlichen Prozesse während der fetalen bzw. kindlichen Entwicklung durch den Einsatz von COX-2-Hemmern und durch das Fehlen der Prostaglandine beeinflusst werden. Aber auch den Einsatz dieser Substanzgruppe bei Erwachsenen gilt es kritisch zu überdenken und dessen Auswirkungen auf den Organismus weiter zu erforschen. Insbesondere deswegen, weil erst kürzlich ein Vertreter dieser Gruppe wegen letaler Nebenwirkungen vom Markt genommen wurde.

IV.2. Einfluss von NO-Substanzen auf die Nephrogenese

Den Aspekt einer Vasodilatation und dessen Auswirkung auf die Nephrogenese zu untersuchen, war das nächste Ziel. Hinreichend bekannt war bislang, dass geringe

Konzentrationen an PGE_2 einen vasodilatativen Effekt und hohe PGE_2 -Konzentrationen einen vasokonstriktorisches Effekt aufweisen. Schweda et al. [2004] konnten darüber hinaus diese zum einen dilatativen und zum anderen konstriktorisches Prozesse den jeweiligen Prostaglandinrezeptoren EP-1 bis EP-4 zuordnen. So konnte in EP-2^{-/-}- und in EP-4^{-/-}-Nieren durch Gabe von PGE_2 in unterschiedlichen Konzentrationen lediglich eine Vasokonstriktion beobachtet werden. Eine Vasodilatation blieb aus. Für EP-1^{-/-}- und EP-3^{-/-}-Nieren verhält es sich genau umgekehrt. Daraus schließt man, dass sowohl der EP-2- als auch der EP-4-Rezeptor für die dilatativen Effekte verantwortlich sind.

Allerdings konnten in dieser Studie keine protektiven Effekte einer Vasodilatation auf die Nephrogenese durch Gabe von systemisch wirksamen NO-Substanzen gezeigt werden, weder beim Glomerulumvolumen, noch bei der Distanz der Glomeruli von der Nierenkapsel. Beim letzten zeigte sich eher noch ein schädigender Effekt. Einzig die mit NOC-12 behandelten Tiere wiesen einen geringen, aber signifikant positiven Effekt auf das Glomerulumvolumen auf.

Insgesamt bleibt die Bedeutung einer Vasodilatation für die Nephrogenese jedoch fraglich. Trotzdem sollte, um diesen Aspekt völlig auszuschließen, mit weiteren unterschiedlichen bzw. niedrigeren Konzentrationen experimentiert werden.

IV.3. Einfluss von PPAR-Agonisten auf die Nephrogenese

Da weder durch eine Vasodilatation, noch durch Agonisten an Plasmamembranrezeptoren ein vollkommener nephroprotektiver Effekt, speziell was die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel angeht, erreicht wurde, wurden die Auswirkungen von Liganden an Kernrezeptoren untersucht. Es ist bekannt, dass Prostaglandine auch Liganden an Kernrezeptoren, speziell an $\text{PPAR}\gamma$ und $\text{PPAR}\delta$, sind [Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Mital et al., 2002]. Des Weiteren konnten durch den selektiven Knockout des Gens der PGE_2 -Rezeptoren EP-1 bis EP-4 histologisch keine Nierenveränderungen festgestellt werden [Narumiya und FitzGerald, 2001]. Eine Verbindung zum Cyclooxygenaseweg konnten Lim et al. [1999] herstellen, indem sie beobachteten, dass die reproduktiven Probleme der COX-2^{-/-}-Maus durch Gabe eines $\text{PPAR}\delta$ -Liganden behoben werden konnten. Den Hinweis darauf, dass $\text{PPAR}\gamma$

und PPAR δ auch bei der Organentwicklung eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, gaben Yang et al. [1999] dadurch, dass sie erhöhte PPAR δ mRNA Signale zum Ende der Schwangerschaft und eine Progression der PPAR γ mRNA Expression während der Entwicklung, mit konstant hohen Levels auch nach der Geburt, gemessen haben.

Leider konnten diese Erwartungen durch den Einsatz von Troglitazone als PPAR γ -Agonist und von GW501516 als PPAR δ -Agonist in keiner Weise erfüllt werden. Ganz im Gegenteil, sie sind sogar weiter schädigend. So liegen die gemessenen Werte signifikant unter denen der unbehandelten COX-2^{-/-}-Maus sowohl was die Glomerulumvolumina angeht als auch die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel. Einzig die mit GW501516 behandelten Tiere weisen bei den Kapseldistanzen der Glomeruli ähnliche Werte auf wie das unbehandelte COX-2^{-/-}-Tier, jedoch keinen nephroprotektiven Effekt.

Asano et al. [2000] beschrieben eine unterdrückte bzw. gehemmte Proliferation verschiedener Zelltypen, unter anderem von Mesangiumzellen durch PPAR-Liganden. Denkbar, dass NSAIDs als PPAR γ -Liganden, wenn auch mit geringer Affinität [Lehmann et al., 1997; Mital et al., 2002], einen Teil ihrer schädigenden Wirkung über diesen Weg entfalten. Dies sollte Gegenstand folgender Studien sein.

Die Glomerulumvolumina und die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel wurden als die entscheidenden bzw. spezifischen „Marker“ der regelgerechten Nephrogenese angesehen. Dabei soll die Angabe des prozentualen Anteils der Glomeruli innerhalb einer 58 μ m Zone die Nephrodysgenese bzw. deren *Rescue* unterstreichen. Die jeweils erhobene Ratio aus Gesamtnierengewicht zum Körpergewicht korrelierte selten mit dem beobachteten histologischen Nierenschaden. Sie erwies sich als sehr fehleranfällig, was an einer unpräzisen Arbeitsweise bei der Nierenpräparation liegen kann. Daher wurden diese Werte zwar mit in die Arbeit aufgenommen, sollen aber nicht weiter diskutiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach meinen Untersuchungen die regelgerechte Nephrogenese scheinbar auf eine direkte Prostaglandin E₂-Wirkung zurückzuführen ist. Hier haben sich speziell die PGE₂-Rezeptoren EP-2 und EP-4 als besonders wichtig für diesen Prozess erwiesen. Vor allem, was die Volumen der Glomeruli

betrifft. Diesen Schluss lässt auch der umgekehrte Versuch mit COX-2-Hemmern an Wildtyp-Mäusen zu. Allerdings sind hier auch, wie im COX-2^{-/-}-Modell, die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel reduziert. Da dieser Defekt jedoch weder durch EP-2- bzw. EP-4-Agonisten, noch durch vasodilatative Prozesse, oder auf Kernrezeptorebene ausgeglichen werden konnte, führt dies zu der Annahme, dass für diesen Aspekt noch andere Mechanismen verantwortlich sein müssen. Denkbar sind hier Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Möglicherweise kommt es hier einfach auf die richtige Balance zwischen den einzelnen Systemen an.

V. Zusammenfassung

Die Einnahme von NSAIDs während der Schwangerschaft, speziell im 3. Trimenon, stellt beim Menschen ein erhebliches Problem für die fetale Nierenentwicklung dar. Zahlreiche tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass durch selektiven Knockout des COX-2-Gens, aber auch durch pharmakologische Inhibition der Cyclooxygenase-2 von NSAIDs, die Nephrogenese nachhaltig beeinträchtigt wird. So stellten sich diese Nieren makroskopisch als klein und blass dar. Mikroskopisch konnte das Bild einer unterentwickelten Niere mit kleinen, zusammengedrängten, subkapsulär gelegenen Glomeruli beobachtet werden. Diese Glomeruli liegen in einem dünnen Kortex mit zystischen Formationen. Die Tiere verstarben nach 4-5 Monaten aufgrund der resultierenden Niereninsuffizienz.

In der vorliegenden Arbeit wurden, um die schädigenden Einflüsse der NSAIDs noch einmal näher zu beleuchten, Versuche mit verschiedenen, in der Klinik eingesetzten, selektiven COX-2-Hemmern durchgeführt. Es wurde zudem der Frage nachgegangen, über welche Mechanismen bzw. Rezeptoren Prostaglandine die Nephrogenese beeinflussen. Dazu kamen neben Agonisten an EP-2- und EP-4-Rezeptoren auch solche an PPAR γ - und PPAR δ -Rezeptoren zum Einsatz. Ein EP-4-Antagonist im EP-2^{-/-}-Modell sollte dessen besondere Bedeutung zeigen. Des Weiteren wurden die vasodilatativen Effekte diverser NO-Substanzen auf die Nephrogenese untersucht.

Es zeigte sich sowohl für Agonisten am EP-2-Rezeptor als auch für solche am EP-4-Rezeptor ein in dosisabhängiger Weise überaus positiver Effekt, was die Glomerulumvolumina angeht, sodass die behandelten Tiere nicht von denen des Wildtyps unterschieden werden können. Dabei erwies sich der EP-4-Rezeptor als der mit den deutlicheren Effekten. In puncto Distanzen der einzelnen Glomeruli von der Nierenkapsel, was ein Hinweis für die Kortexreifung darstellt, war nur vom EP-4-Agonisten ein Partialeffekt zu verzeichnen. Dabei spielte die Konzentration keine Rolle.

Von den NO-Substanzen zeigte nur NOC-12 einen minimalen, wenn auch signifikant positiven Effekt auf die Glomerulumvolumina. Die mit Spermine NONOate behandelten Tiere waren, außer in einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$, hier nicht signifikant vom unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier zu unterscheiden. Bei den Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel war ein über das Bild der unbehandelten COX-2^{-/-}-Maus hinaus signifikant schädigender Effekt zu beobachten.

Auch die Ergebnisse der PPAR γ - bzw. PPAR δ -Agonisten sind durchweg ernüchternd. Keine der eingesetzten Substanzen, Troglitazone und GW 501516, konnte ein positives Ergebnis, was die Glomerulumvolumina und die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel angeht, aufweisen. Vielmehr zeigen sie sich noch über das COX-2^{-/-}-Bild hinaus schädigend. Einzig das mit GW501516 behandelte Tier war von einem unbehandelten COX-2^{-/-}-Tier, in Bezug auf die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel, nicht signifikant zu unterscheiden.

Der selektive COX-2-Hemmer SC-236 weist ein von der Dosis und von der Applikationsart abhängiges Ergebnis auf. Dies gilt sowohl für die Glomerulumvolumina als auch für die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel. Die mit 30 $\mu\text{g/ml}$ SC-236, mit Parecoxib und mit Rofecoxib behandelten Nieren sind von der einer COX-2^{-/-}-Maus, in puncto Glomerulumvolumina signifikant zu unterscheiden. Das gilt jedoch nicht für die Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel. Hier haben Parecoxib und Rofecoxib nur einen Partialeffekt, wobei Rofecoxib das stärker wirksame ist. Bei SC-236 reicht die Spannweite von Partialeffekt bis hin zu über das COX-2^{-/-}-Bild hinaus schädigend. Der eingesetzte EP-4-Antagonist zeigte im EP-2^{-/-}-Modell in beiden Bereichen einen signifikanten Partialeffekt. Hier sind wahrscheinlich höhere Konzentrationen nötig, um ein volles COX-2^{-/-}-Bild zu erzeugen.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass die regelgerechte Nierenentwicklung, speziell was die Glomerulumvolumina angeht, sehr stark sowohl vom EP-2-Rezeptor als auch vom EP-4-Rezeptor abhängig ist. Für die richtigen Distanzen der Glomeruli von der Nierenkapsel scheint nicht allein der EP-4-Rezeptor verantwortlich zu sein. Hier müssen noch weitere Mechanismen eine Rolle spielen. Die Prozesse über die Kernrezeptoren PPAR γ und PPAR δ sind es wohl nicht, sodass dieser Sektor wieder verlassen werden kann. Auch vasodilatative Mechanismen scheinen nicht zum Ziel zu führen. Möglich, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine entsprechende Rolle spielt und es einfach auf die richtige Balance der einzelnen Systeme ankommt. Dies sollte in weiteren Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden. Der Einsatz von NSAIDs während der fetalen Nierenentwicklung, speziell im 3. Trimenon, kann aufgrund der gezeigten erheblichen Schäden nicht empfohlen werden. Sie sind vielmehr kontraindiziert.

VI. Literaturverzeichnis

Asano T, Wakisaka M, Yoshinari M, Iino K, Sonoki K, Iwase M, Fujishima M: Peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) expresses in rat mesangial cells and PPAR γ agonists modulate its differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1497: 148-154, 2000

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366, 1996

Brenner BM: Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol* 249: F324-F337, 1985

Breyer MD und Badr KF: Arachidonic acid metabolites and the kidney, in *The Kidney* (vol 1), edited by Brenner MB, Philadelphia, WB Saunders, 754-788, 1996

Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM: Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 7: 8-17, 1996

Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR: Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax-2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 128: 4747-4756, 2001

Bullock SL, Fletcher JM, Beddington JS, Wilson VA: Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 15: 1894-1906, 1998

Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, Pullano R, Piscione TD, Grisaru S, Soon S, Sedlackova L, Tanswell AK, Mak TW, Yeager H, Lockwood GA, Rosenblum ND, Filmus J: Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* 146: 255-264, 1999

Crofford LJ: COX-1 and COX-2 tissue expression: Implications and predictions. *J Rheumatol* 24 (Suppl 49): 15-19, 1997

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R: Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E-2 and interleukin-1 beta. *Endocrinology* 140: 2685-2695, 1999

Day NA, Attallah AA, Lee JB: Letter: Presence of prostaglandin A and F in fetal kidney. *Prostaglandins* 5: 491-493, 1974

DeWitt DL, Meade EA, Smith WL: PGH synthase isoenzyme selectivity: the potential safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med* 95: 40s-44s, 1993

Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, Gorry SA, Trzaskos JM: Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378: 406-409, 1995

Dressler GR: The genetic control of renal development. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 253-257, 1995

Dudley AT und Robertson EJ: Overlapping expression of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn* 208: 349-362, 1997

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ: A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9: 2795-2807, 1995

Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM Jr, Milbrandt J: GFRa1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21: 317-324, 1998

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM: 15-Deoxy-d 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-812, 1995

Gomez RA, Norwood VF: Recent advances in renal development. *Current Opinion in Pediatrics* 11(2): 135-142, 1999

Guan Y, Zhang Y, Davis L, Breyer MD: Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol* 273 (Renal Physiol 42): F1013-F1022, 1997

Harris RC, McKanna JA, Akai J, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94: 2504-2510, 1994

Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, Soares VC, Lai E: Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* 10: 1467-1478, 1996

Henrich WL: Role of prostaglandins in renin secretion. *Kidney Int* 19: 822-830, 1981

Heuden AD, Provoost A, Nauta J, Grose W, Oranje WA, Wolff ED, Sauer PJ: Renal functional impairment in preterm neonates related to intrauterine indomethacin exposure. *Pediatr Res* 24: 644-648, 1988

Kaji DM, Chase HS, Eng JP, Diaz J: Prostaglandin E(2) inhibits Na-K-2Cl cotransport in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol* 271:C354-C361, 1996

Kaplan BS, Restaino I, Raval DS, Gottlieb RP, Bernstein J: Renal failure in the neonate associated with in utero exposure to non-steroidal anti-inflammatory agents. *Pediatr Nephrol* 8: 700-704, 1994

Keller H und Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors. *Trends Endocrinol Metab* 4: 291-296, 1993

Khan KN, Stanfield KN, Dannenberg A, Seshan SV, Baergen RN, Baron DA, Soslow RA: Cyclooxygenase-2 Expression in the Developing Human Kidney. *Pediatric and Developmental Pathology* 4: 461-466, 2001

Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL: Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: Implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 26: 612-620, 1998

Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819, 1995

Kömhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: Implication for renal function. *Am J Physiol* 272: F460-F468, 1997

Kömhoff M, Wang JL, Cheng HF, Langenbach R, McKanna JA, Harris RC, Breyer MD: Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. *Kidney International* 57: 414-422, 2000

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-691, 1993

Kujubu DA und Herschmann HR: Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* 267: 7991-7994, 1992

- Kume T**, Deng K, Hogan BL: Murine forkhead/winged helix genes *Foxc1* (*Mf1*) and *Foxc2* (*Mfh1*) are required for early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* 127: 1387-1395, 2000
- Kuure S**, Vuolteenaho R, Vainio S: Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of Development* 92: 31-45, 2000
- Langenbach R**, Loftin CD, Lee C, Tiano H: Cyclooxygenase-deficient Mice: A Summary of Their Characteristics and Susceptibilities to Inflammation and Carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 889: 52-61, 1999
- Lehmann JM**, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA: Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406-3410, 1997
- Lemley KV**, Schmitt SL, Holliger C, Dunn MJ, Robertson CR, Jamison RL: Prostaglandin synthesis inhibitors and vasa recta erythrocyte velocities in the rat. *Am J Physiol* 247: F562-F567, 1984
- Leone R**, Conforti A, Ghiotto E, Moretti U, Valvo E, Velo GP: Nimesulide and renal impairment. *Eur J Clin Pharmacol* 55: 151-154, 1999
- Lim H**, Gupta RA, Ma WG, Paria PC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK: Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Genes Dev* 13: 1561-1574, 1999
- Lim H**, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach JM, Trzaskos JM, Dey SK: Multiple female reproductive failure in cyclooxygenase-2 – deficient mice. *Cell* 91: 197-208, 1997
- Mandrup S und Lane MD**: Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272: 5367-5370, 1997
- Masferrer JL**, Seibert K, Zweifel B, Needleman P: Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3917-3921, 1992
- McCright B**, Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T: Defects in the development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic *Notch2* mutation. *Development* 128: 491-502, 2001

Meade EA, Smith WL, DeWitt DL: Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268: 6610-6614, 1993

Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J: Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development* 126: 1139-1148, 1999

Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM: Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 269: 11769-11775, 1994

Mital A, Vats RK, Ramachandran U: PPARs : Nuclear Receptors for Antidiabetics. *Cribs* 3-1: 5-8, 2002

Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR: Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11693-11697, 1993

Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S: Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124: 1653-1664, 1997

Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I: Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest* 105: 863-873, 2000

Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A: Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76-79, 1996

Moore und Persaud: Embryologie – Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen; Schattauer (1996)

Morath R, Klein T, Seyberth HW, Nüssing RM: Immunolocalization of the Four Prostaglandin E₂ Receptor Proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in Human Kidney. *J Am Soc Nephrol* 10:1851-1860, 1999

Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O: Prostaglandin Synthase 2 Gene Disruption Causes Severe Renal Pathology in the Mouse. *Cell* 83: 473-482, 1995

Narumiya S und FitzGerald GA: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108: 25-30, 2001

Niebyl JR und Witter FR: Neonatal outcome after indomethacin treatment for pre-term labor. *Am J Obstet Gynecol* 155: 747-749, 1986

Nishinakamura R, Matsumo Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Scully S, Lacey DL, Katsuki M, Asashima M, Yokota T: Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 128: 3105-3115, 2001

Norton ME, Merrill J, Cooper BAB, Kuller JA, Clyman RI: Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor. *N Engl J Med* 329: 1602-1607, 1993

Norwood VF, Morham SG, Smithies O: Postnatal development and progression of renal dysplasia in cyclooxygenase-2 null mice. *Kidney International* 58: 2291-2300, 2000

Novy MJ: Effects of indomethacin on labor, fetal oxygenation, and fetal development in rhesus monkeys. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 4: 285-300, 1978

O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA: A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* 266: 23261-23267, 1991

Pallone TL: Vasoconstriction of outer medullary vasa recta by angiotensin II is modulated by proataglandin E2. *Am J Physiol* 266: F850-F857, 1994

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H: Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73-76, 1996

Qiao J, Uzzo R, Obara-Ishihara T, Degenstein L, Fuchs E, Herzlinger D: FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney. *Development* 126: 547-554, 1999

Restaino I, Kaplan BS, Kaplan P, Rosenberg H, Witzleben C, Roberts N: Renal dysgenesis in a monozygotic twin. Association with in utero exposure to indomethacin. *Am J Med Genet* 39: 252-257, 1991

Rohen und Lütjen-Drecol: Funktionelle Embryologie; Schattauer (2003)

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M: Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 70-73, 1996

Schlondorff D und Ardaillou R: Prostaglandins and other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int* 29: 108-119, 1986

Schoonjans K, Steals B, Auwerx J: The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302: 93-109, 1996

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367: 380-383, 1994

Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nüsing RM, Kurtz A: Stimulation of renin release by prostaglandin E₂ is mediated by EP₂ and EP₄ receptor in mouse kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F427-F433, 2004

Silldorf EP, Yang S, Pallone TL: Prostaglandin E₂ abrogates endothelin-induced vasoconstriction in renal outer medullary descending vasa recta of the rat. *J Clin Invest* 95: 2734-2740, 1995

Simeoni U, Messer J, Weisburd P, Haddad J, Willard D: Neonatal renal dysfunction and intrauterine exposure to prostaglandin synthesis inhibitors. *Eur J Pediatr* 148: 371-373, 1989

Smith WL, DeWitt DL: Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 15: 179-194, 1995

Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL: Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 49: 153-179, 1991

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372: 679-683, 1994

Stokes JB: Effect of prostaglandin E₂ on chloride transport across the rabbit thick ascending limb of Henle. *J Clin Invest* 64: 495-502, 1979

Vamecq J und Latruffe N: Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 354: 141-148, 1999

van der Heijden BJ, Carlus C, Narcy F, Bavoux F, Delezoide AL, Gubler MC: Persistent anuria, neonatal death and renal microcystic lesion after prenatal exposure to indomethacin. *Am J Obstet Gynecol.* 171: 617-623, 1994

Williams CS und DuBois R: Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am J Physiol* 270: G393-400, 1996

Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R: Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nature Genet* 23: 113-117, 1999

Yang T, Michele DE, Park J, Smart AM, Lin Z, BrosiusIII FC, Schnermann JB, Briggs JP: Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am J Physiol* 277 (Renal Physiol 46): F966-F973, 1999

Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, McKanna JA: Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol* 273: F994-F1002, 1997

VII. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AA	Arachidonic acid (Arachidonsäure)
Abb.	Abbildung
AL	Arbeitslösung
ASS	Acetylsalicylsäure
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
d	Durchmesser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (zweifach entionisiertes Wasser)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen Diamin Tetra-Acetat
EP-2A, EP-4A	EP-2 Agonist, EP-4 Agonist
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HCl	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Meter
M	molar, Mol
min	Minuten
MM	Metanephrogenes Mesenchym
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NaCl (0,9%)	(isotonische) Kochsalzlösung
NO	Nitric Oxide (Stickoxid)
NSAID	Non steroidal anti-inflammatory drug (nichtsteroidale Antirheumatika)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostacyclin
PG _x _y	Prostaglandin _x _y
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBF	Renaler Blutfluss
RNase	Ribonuclease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Stromazelle
s.c.	subcutan
SDS	Dodecylschwefelsäure Natriumsalz
SL	Stammlösung
T	Tränke
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UK	Ureterknospe
UV	Ultraviolett
V	Volt, Volumen
WT	Wildtyp

VIII. Anhang

VIII.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubyko, Daut, Dünne, Feuser, Gerdes, Geus, Göke, Görg, Griss, Gudermann, Hasilik, Herzum, Hofbauer, Hofmann, Jungclas, Klenk, Klose, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Lang, Lill, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seitz, Seyberth, Steiniger, Studer, Wagner, Westermann, Zielke

VIII.2. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. R.M. Nüsing, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, für die Bereitstellung des Themas, die fachliche und kollegiale Betreuung, sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Weiterer Dank gilt den Tierpflegerinnen und -pflegern des Mausstalls für die fachgerechte Betreuung und Versorgung der Mäuse.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen des Labors für molekulare und experimentelle Pharmakologie für die nette Einarbeitung und den gehabten Spaß, während der auch oftmals stressigen Arbeit, bedanken.

Nicht minder Dank gilt meinen Korrekturlesern Patrick und meiner lieben Freundin Tina. Ich weiß, dass es für beide nicht leicht war sich durch dieses Werk zu arbeiten.

Allerdings der größte Dank gebührt meinen Eltern für ihre in jeder Lage großartige Unterstützung, ohne die ich jetzt nicht hier sitzen würde, um diese Zeilen zu schreiben.